

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年10 月7 日 (07.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/085652 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/53,
C12Q 1/68, C12N 9/08, C12C 1/00

創造フロンティア研究所内 Shizuoka (JP). 武田 和義
(TAKEDA, Kazuyoshi) [JP/JP]; 〒7100031 岡山県倉敷
市有城 1 1 6 9 - 1 7 1 Okayama (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004217

(22) 国際出願日: 2004 年3 月25 日 (25.03.2004)

(74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.); 〒1040061 東京都中央区銀座一丁目10番6号 銀座ファーストビル 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-083924 2003 年3 月25 日 (25.03.2003) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NL, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サッポロビール株式会社 (SAPPORO BREWERIES LIMITED) [JP/JP]; 〒1508522 東京都渋谷区恵比寿四丁目20番1号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 廣田 直彦 (HI-ROTA, Naohiko) [JP/JP]; 〒3700393 群馬県新田郡新田町木崎37-1 サッポロビール株式会社 バイオリソース開発研究内 Gunma (JP). 金子 隆史 (KANEKO, Takafumi) [JP/JP]; 〒3700393 群馬県新田郡新田町木崎37-1 サッポロビール株式会社 バイオリソース開発研究内 Gunma (JP). 黒田 久夫 (KURODA, Hisao) [JP/JP]; 〒4250013 静岡県焼津市岡当目10 サッポロビール株式会社 価値創造フロンティア研究所内 Shizuoka (JP). 金田 弘幸 (KANEDA, Hirotaka) [JP/JP]; 〒4250013 静岡県焼津市岡当目10 サッポロビール株式会社 価値創造フロンティア研究所内 Shizuoka (JP). 蛸井 潔 (TAKOI, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒4250013 静岡県焼津市岡当目10 サッポロビール株式会社 価値

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受理の際には再公開される。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: BARLEY LIPOXYGENASE 1 GENE, METHOD OF SELECTING BARLEY VARIETY, MATERIAL OF MALT ALCOHOLIC DRINKS AND PROCESS FOR PRODUCING MALT ALCOHOLIC DRINK

(54) 発明の名称: 大麦リポキシゲナーゼ-1遺伝子、大麦の選抜方法、麦芽アルコール飲料用原料及び麦芽アルコール飲料の製造方法

(57) Abstract: A method of selecting a barley variety lacking barley lipoxygenase-1 characterized by distinguishing a barley variety lacking barley lipoxygenase-1 by examining whether or not guanine at the splicing donating site in the intron 5 of barley lipoxygenase-1 gene has mutated into another base; and a process for producing a malt alcoholic drink by using a material of malt alcoholic drinks derived from the barley variety obtained by the above selection method.

(57) 要約: 大麦リポキシゲナーゼ-1遺伝子第5イントロンのスプライシング供与部位のグアニンが他の塩基に変異しているか否かにより大麦リポキシゲナーゼ-1欠失大麦を判別することを特徴とする大麦リポキシゲナーゼ-1欠失大麦の選抜方法とこの選抜方法によって得られた大麦に由来する麦芽アルコール飲料用原料を用いた麦芽アルコール飲料の製造方法。

WO 2004/085652 A1

BEST AVAILABLE COPY

明細書

大麦リポキシゲナーゼ-1遺伝子、大麦の選抜方法、麦芽アルコール飲料用原料及び麦芽アルコール飲料の製造方法

技術分野

- 5 【0001】 本発明は、大麦リポキシゲナーゼ-1遺伝子、大麦の選抜方法、麦芽アルコール飲料用原料及び麦芽アルコール飲料の製造方法に関する。

背景技術

- 10 【0002】 麦芽に含まれる酵素である大麦リポキシゲナーゼ-1（以下、「LOX-1」という）は、麦芽アルコール飲料を製造する際の仕込工程において麦芽由来のリノール酸を酸化し9-ヒドロペルオキシオクタデカジエン酸を生成する（Kobayashi, N. et al., J. Ferment. Bioeng., 76, 371-375, 1993）。そして、9-ヒドロペルオキシオクタデカジエン酸はさらにペルオキシゲナーゼ様活性によりトリヒドロキシオクタデセン酸（THOD）へと変換される（Kuroda, H., et al., J. Biosci. Bioeng., 93, 73-77, 2002）。このTHODは、ビールの泡もちを低下させ、また収斂味を与えたり、切れを悪くすることが知られ（Kobayashi, N., J. Am. Soc. Brew. Chem. 60: 37-41, 2002; Kaneda, H. et al., J. Biosci. Bioeng., 92, 221-226, 2001）、麦芽アルコール飲料の品質の低下を招くことが知られている。また、9-ヒドロペルオキシオクタデカジエン酸は、老化した麦芽アルコール飲料のカードボード臭の原因物質とされるトランス-2-ノネナールにも変換され
- 15 ることが知られている（安井 醸造協会誌 96: 94-99（2001））。

- 20 【0003】 麦芽アルコール飲料の香味耐久性を改善するため、トランス-2-ノネナールの生成を抑える技術として、LOX-1活性の低い麦芽を用いる麦芽アルコール飲料を製造する方法が提案されている（Drost, J. Am. Soc. Brew. Chem. 48:124-131（1990））。

- 25 【0004】 また、Doumaらは大麦に変異原（薬剤）処理を施すことにより誘発突然変異を起こし、LOX-1活性が対照の9%に低下した誘発突然変異

系統を作出し、それを用いて麦芽アルコール飲料の製造を試みている（国際公開第02/053721号パンフレット）。

【0005】 しかし、そのような大麦を用いても、得られる麦芽アルコール飲料のトランス-2-ノネナール濃度の低減は不十分なものであり、香味耐久性が
5 十分改善されていない。また、THOD量の低減や泡持ちの改善に関しては何等明らかにされていない。

発明の開示

【0006】 本発明は、上記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、遺伝子操作することなく、香味耐久性や泡持ちを改善された麦芽アルコール
10 飲料を製造するために有用な、LOX-1変異遺伝子と、LOX-1欠失大麦の選抜方法と、選抜によって得られた大麦に由来する麦芽アルコール飲料用原料と、前記麦芽アルコール飲料用原料を用いた麦芽アルコール飲料の製造方法と、を提供することを目的とする。

【0007】 本発明者らは、上記目的を達成すべき鋭意研究を重ねた結果、LOX-1活性を全く欠いた在来大麦品種を見出すとともに、当該大麦品種から新規なLOX-1変異遺伝子を見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】 すなわち、本発明のLOX-1変異遺伝子は、既知のLOX-1遺伝子の第5イントロンのスプライシング供与部位（5'-GT-3'）のグアニンが他の塩基に変異していることを特徴とする。ここで、前記他の塩基がアデニンであることが好ましい。

【0009】 また、本発明のLOX-1欠失大麦の選抜方法は、LOX-1遺伝子第5イントロンのスプライシング供与部位のグアニンが他の塩基に変異しているか否かにより大麦LOX-1欠失大麦を判別することを特徴とする。ここで、前記他の塩基がアデニンであることが好ましい。

【0010】 さらに、本発明のLOX-1欠失大麦の選抜方法は、被検対象である大麦からゲノムDNAを抽出するゲノムDNA抽出工程と、抽出したゲノム

DNAからLOX-1遺伝子第5イントロンのスプライシング供与部位を含むDNA断片を増幅するDNA断片増幅工程と、前記DNA断片増幅工程で増幅されたLOX-1遺伝子第5イントロンのスプライシング供与部位を含むDNA断片を制限酵素で切断して所定の塩基数のDNA断片を検出し、スプライシング供与部位のグアニンが他の塩基に変異しているか否かにより大麦LOX-1欠失大麦を判別するDNA断片検出工程と、を含むことを特徴とする。

【0011】 ここで、前記DNA断片検出工程において使用する制限酵素が塩基配列5'-GTAC-3'を認識するAfaIおよび/またはRsaIであることが好ましい。

10 【0012】 上記発明によれば、LOX-1遺伝子第5イントロンのスプライシング供与部位のグアニンの変異の有無に基づき、LOX-1活性欠失形質を有する大麦品種であるか否かを選別することが可能となる。

15 【0013】 その結果、LOX-1活性を直接測定しなくとも遺伝子レベルの解析で容易にLOX-1活性を欠いた大麦品種を選別することができる。特に、酵素活性は直物個体の生育段階、環境などに影響され正確な測定が困難な場合があるが、この方法によれば酵素測定と異なり環境などに影響されることなくLOX-1活性が欠失した大麦品種を選抜することができる。さらに、酵素活性を測定するには種子が実るまで行うことができないが、DNA判別は生育初期に行えるため早期に活性欠失形質か否かの判定ができ、また連続戻し交配などに有効である。

20 【0014】 また、本発明の麦芽アルコール飲料用原料は、本発明のLOX-1変異遺伝子を持つ大麦に由来する種子、麦芽、モルトエキス、大麦分解物または大麦加工物であることを特徴とする。

25 【0015】 また、本発明の麦芽アルコール飲料用原料は、本発明のLOX-1欠失大麦の選抜方法により選抜された大麦に由来する種子、麦芽、モルトエキス、大麦分解物または大麦加工物であることを特徴とする。

【0016】 さらに、本発明の麦芽アルコール飲料の製造方法は、本発明の麦芽アルコール飲料用原料を用いることを特徴とする。

5 【0017】 上記本発明によれば、原料中にLOX-1を含まないため、麦芽アルコール飲料の製造工程においてリノール酸から9-ヒドロペルオキシオクタデカジエン酸が生成し難くなり、したがってTHODやトランス-2-ノネナールも生成し難くなるため、香味耐久性と泡持ちが向上した麦芽アルコール飲料を得ることができる。

10 【0018】 本発明は、また、配列番号10の1～1554番目の塩基で表される塩基配列からなる核酸を提供する。かかる塩基配列は、LOX-1タンパク質のリボキシゲナーゼ活性を欠いた変異LOX-1タンパク質をコードする遺伝子のコード領域を表している。大麦サンプル中の当該核酸の有無を検出することにより、当該大麦がLOX-1活性欠失形質を有するか否かを見分けることが可能となる。

15 【0019】 本発明は、また、配列番号11で表される塩基配列からなる核酸を提供する。かかる塩基配列は、LOX-1タンパク質のリボキシゲナーゼ活性を欠いた変異LOX-1タンパク質をコードする遺伝子のゲノム配列を表している。大麦サンプル中の当該核酸の有無を検出することにより、当該大麦がLOX-1活性欠失形質を有するか否かを見分けることが可能となる。

20 【0020】 本発明は、また、配列番号11で表される塩基配列からなる核酸において、3178番目の塩基を含む10～60の連続した塩基配列からなる核酸を提供する。3178番目の塩基は一塩基多型であり、正常LOX-1ではGであるが、変異LOX-1ではAである。大麦サンプル中の多型部位を含む核酸の存在の有無を検出することにより、当該大麦がLOX-1活性欠失形質を有するか否かを見分けることが可能となる。

25 【0021】 本発明は、また、大麦サンプルからゲノムDNAを単離する工程と、配列番号11で表される塩基配列の3178番目の塩基を検出し、その塩基

の存在を当該大麦のLOX-1活性の存在の指標とする工程と、を含む、大麦におけるLOX-1活性の存在を検出する方法を提供する。かかる方法によれば、検査対象の大麦がLOX-1活性欠失形質を有するか否かを見分けることが可能となる。

- 5 【0022】 このようにして見出されたLOX-1活性を欠失している大麦に由来する種子、麦芽、モルトエキス、大麦分解物または大麦加工物等を原料として麦芽アルコール飲料を製造すれば、香味耐久性と泡持ちが向上した麦芽アルコール飲料を得ることができる。

図面の簡単な説明

- 10 【0023】 図1は、探索試験1におけるLOX-1活性の結果を示すグラフである。

【0024】 図2は、証明試験1におけるLOX-1阻害活性の結果を示すグラフである。

- 15 【0025】 図3は、証明試験2における大麦種子のLOXタンパク質のウェスタン解析の結果を示す電気泳動写真である。AはSDS-PAGE後のウェスタン解析の結果を示し、BはIEF後のウェスタン解析の結果を示す。

【0026】 図4は、証明試験3における大麦種子のRNAのRT-PCR解析の結果を示す電気泳動写真である。

- 20 【0027】 図5は、証明試験4におけるLOX-1遺伝子第5イントロンスプライシング供与部位の構造を示す図である。

【0028】 図6は、証明試験5におけるLOX-1変異遺伝子のスプライシングについて解析した結果を示す電気泳動写真である。Aは第3イントロン～第5イントロンを含む増幅断片の電気泳動写真であり、BはAと同じ増幅断片をStuIで消化した後の電気泳動写真である。

- 25 【0029】 図7は、証明試験7、8における大腸菌における発現誘導タンパク質の電気泳動写真である。

【0030】 図8は、証明試験7、8における大腸菌において発現誘導させたLOX-1の活性を示すグラフである。

【0031】 図9は、証明試験9におけるKendall×SBOU2の雑種第2世代におけるDNA多型を示す電気泳動写真である。

5 【0032】 図10は、証明試験9におけるKendall×SBOU2の雑種第2世代におけるDNA多型及び雑種第3世代におけるLOX活性をまとめた図である。

10 【0033】 図11は、実施例1における一般大麦品種／系統のAfaI法による解析の結果を示す電気泳動写真である。

【0034】 図12は、実施例2におけるLOX-1欠失大麦のAfaI法による解析結果を示す電気泳動写真である。

15 【0035】 図13は、実施例2におけるLOX-1欠失大麦の種子LOX活性の結果を示す図である。Aは酵素反応時間5分の結果、Bは酵素反応時間90分の結果を示す図である。

【0036】 図14は、実施例5におけるLOX+F4集団およびLOX-F4集団の種子の麦芽分析の結果を示す図である。

【0037】 図15は、実施例5における麦汁中のトランス-2-ネネナール濃度とノネナールポテンシャルを示す図である。

20 発明を実施するための最良の形態

【0038】 以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

【0039】 まず、本発明にかかるLOX-1変異遺伝子について説明する。

25 【0040】 本発明にかかるLOX-1変異遺伝子は、本発明者らによって見出された新規遺伝子であり、既知のLOX-1遺伝子（配列番号1）と比較して60番目の塩基GがAに置換されていることを特徴とする（配列番号2）。配列番号1の60-61番目はスプライシング供与部位（5'-GT-3'）である

ため、この塩基の置換によりLOX-1はスプライシングに異常をきたし、活性のあるLOX-1を発現できなくなる。

【0041】 なお、配列表の配列番号1には既知のLOX-1遺伝子の第5イントロン領域の塩基配列を、配列番号2には本発明のLOX-1変異遺伝子のLOX-1遺伝子の第5イントロン領域に相当する部分の塩基配列を示した。

【0042】 次に、本発明のLOX-1欠失大麦の選抜方法について説明する。

【0043】 本発明のLOX-1欠失大麦の選抜方法は、LOX-1遺伝子の第5イントロンのスプライシング供与部位のグアニンが他の塩基に変異しているか否かにより大麦LOX-1欠失大麦を判別することを特徴とする。

【0044】 上記の塩基の変異を利用してLOX-1欠失大麦を選抜する方法としては、例えば、プライマー配列の3'末端、あるいはプライマー配列内部に上記変異部位を含むプライマーを用いてDNAの増幅を行い、増幅の有無や増幅効率で塩基の変異を検出し、LOX-1欠失大麦を選抜する方法や上記変異部位を含むDNA断片を増幅し、塩基配列を決定することによっても塩基の変異を検出し、LOX-1欠失大麦を選抜する方法などを用いることが可能である。

【0045】 これら塩基の変異の検出には、DNA断片が検出可能であれば特に制限は無いが、アガロースゲル電気泳動やポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いれば良い。また、増幅の有無や増幅効率でDNA変異を検出する場合には、上記電気泳動のほか、TAQMAN法など定量的PCR法も用いることができる。

【0046】 また、本発明のLOX-1欠失大麦の選抜方法は、好ましくは、被検対象である大麦からゲノムDNAを抽出するゲノムDNA抽出工程と、抽出したゲノムDNAからLOX-1遺伝子第5イントロンのスプライシング供与部位を含むDNA断片を増幅するDNA断片増幅工程と、前記DNA断片増幅工程で増幅されたLOX-1遺伝子第5イントロンのスプライシング供与部位を含む

DNA断片を制限酵素で切断して所定の塩基数のDNA断片を検出し、スプライシング供与部位のグアニンが他の塩基に変異しているか否かにより大麥LOX-1欠失大麥を判別するDNA断片検出工程と、を含むことを特徴とする。

【0047】 まず、本発明にかかるゲノムDNA抽出工程について説明する。

- 5 【0048】 被検対象である大麥からゲノムDNAを抽出する方法としては特に制限はなく、公知の方法によって行うことができるが、具体的には例えば、CTAB法 (Murray et al., 1980, Nucleic Acids Res. 8:4321-4325) や Ethidium bromide 法 (Varadarajan and Prakash 1991, Plant Mol. Biol. Rep. 9:6-12) によって抽出することができる。ここで、ゲノムDNAを抽出する組織は大麥種子のみならず、葉、茎、根等を用いることも可能である。例
- 10 えば、葉を用いることで、戻し交配世代途中の多数の個体選抜に利用することが可能となる。

【0049】 次に本発明にかかるDNA断片増幅工程について説明する。

- 15 【0050】 DNA断片を増幅する方法としては特に制限されないが、例えば、PCR法 (Polymerase Chain Reaction Method) によって行うことができる。ここで、PCR法において用いられるプライマーは、LOX-1遺伝子第5イントロンのスプライシング供与部位を含むDNA断片を増幅することができる領域に設定されているものであれば、塩基配列は特に制限されないが、具体的には例えば、LOX-1遺伝子において塩基数が1
- 20 0～60個の連続した塩基であることが好ましく、15～30個の連続した塩基であることがより好ましい。また、一般的には、プライマーの塩基配列におけるGC含量が40～60%であることが好ましい。さらに、PCR法に用いる二つのプライマーのプライマー間のT_m値に差がないまたは少ないことが好ましい。また、プライマー内で2次構造を取らないことが好ましい。

- 25 【0051】 次に本発明にかかるDNA断片検出工程について説明する。

【0052】 本発明にかかるLOX-1変異遺伝子は、上述したように既知の

LOX-1と塩基配列に相違が見られるため、当該相違部分を認識するまたは切断する制限酵素を用いて増幅産物を切断すれば、得られるDNA断片のサイズに相違が見られる。本発明にかかる制限酵素としては、このように前記相違部分を認識するまたは切断するものであれば特に制限はないが、既にこのような作用を有することが判明している制限酵素AfaIおよび/またはRsaIであることが好ましい。

【0053】 すなわち、本発明のLOX-1変異遺伝子は、スプライシング供与部位のグアニンが他の塩基に変異していることにより、既知のLOX-1遺伝子に存在していた制限酵素AfaIおよびRsaIの切断部位（5'-GTAC-3'：第5イントロン60-63番目）が消失している。その結果、この切断部位を含む遺伝子増幅産物をAfaIおよび/またはRsaIで切断した際の切断パターンが既知のLOX-1遺伝子の場合と異なるため、LOX-1変異遺伝子か否かを判別することが可能である。

【0054】 また、所定の塩基数のDNA断片とは、前記相違部分が存在することにより、増幅産物を制限酵素で切断して得られるDNA断片のサイズに相違が見られるようなDNA断片であれば、その塩基数は特に制限されない。

【0055】 また、本工程にかかる検出とは、制限酵素によって切断されたDNA断片が検出可能な方法であれば特に制限されないが、具体的には例えば、アガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって検出すればよい。

【0056】 次に、本発明の麦芽アルコール飲料用原料について説明する。

【0057】 本発明の麦芽アルコール飲料用原料は、本発明のLOX-1変異遺伝子を持つ大麦に由来する種子、麦芽、モルトエキス、大麦分解物または大麦加工物であることを特徴とし、また、本発明の大麦の選抜方法によって選抜された大麦に由来する種子、麦芽、モルトエキス、大麦分解物または大麦加工物であることを特徴とする。

【0058】 ここで、モルトエキスとは麦芽の抽出物を指し、例えば麦芽中の糖成分やタンパク質成分の抽出物等が挙げられる。大麦分解物とは大麦を酵素等で分解処理したものを指し、大麦糖化液等がこれに該当する。大麦加工物とは麦芽アルコール飲料の副原料として使用される大麦粉碎物などがこれに該当する。

5 【0059】 本発明の麦芽アルコール飲料用原料はLOX-1を含まないため、麦芽アルコール飲料の製造工程においてリノール酸から9-ヒドロペルオキシオクタデカジエン酸が生成し難くなり、したがってTHODやトランス-2-ノネナールも生成抑制が期待され、香味耐久性と泡持ちが向上した麦芽アルコール飲料を得ることが期待できる。

10 【0060】 次に、本発明の麦芽アルコール飲料の製造方法について説明する。

 【0061】 本発明の麦芽アルコール飲料の製造方法は、本発明の麦芽アルコール飲料用原料を用いることを特徴とする。

 【0062】 まず、本発明にかかる製麦工程について説明する。

15 【0063】 本発明にかかる製麦工程は、LOX-1欠失大麦を用いることを特徴とした麦芽を得る工程であり、製麦の方法としては特に制限されず公知の方法で行えば良い。具体的には、例えば、浸麦度が40%～45%に達するまで浸麦後、10～20℃で3～6日間発芽させ、焙燥して麦芽を得ることができる。

 【0064】 次に、本発明にかかる仕込工程について説明する。

20 【0065】 本発明にかかる仕込工程は、前記麦芽を糖化させて麦汁を得る工程である。具体的には、さらに以下の第1～第4の工程に分けられる。

 【0066】 すなわち、第1の工程は、前記麦芽を含む原料と仕込用水とを混合し、得られた混合物を加温することにより麦芽を糖化させ、前記糖化された麦芽から麦汁を採取する仕込み工程である。

25 【0067】 本工程において用いられる麦芽は、大麦に水分と空気を与えて発芽させ、乾燥して幼根を取り除いたものであることが望ましい。麦芽は麦汁製造

に必要な酵素源であると同時に糖化の原料として主要なデンプン源となる。また、麦芽アルコール飲料特有の香味と色素を与えるため発芽させた麦芽を焙燥したものを麦汁製造に用いる。また、さらに原料として、上記麦芽以外に、本発明にかかるLOX-1欠失大麦あるいは一般大麦、コーンスターチ、コーングリッツ、米、糖類等の副原料を添加しても良い。

【0068】 また、前記麦汁の製造工程において、本発明にかかるLOX-1欠失大麦あるいは一般大麦より調製されたモルトエキスあるいは大麦分解物、大麦加工物を仕込み用水と混合し、必要に応じて前記副原料を添加し麦汁を得ることができる。

【0069】 前記麦芽は仕込み用水に添加した後、混合される。前記副原料を添加する場合には、ここで混合すればよい。糖類の場合は、後述の煮沸の前に添加してもよい。また、前記仕込み用水は特に制限されず、製造する麦芽アルコール飲料に応じて好適な水を用いればよい。糖化は基本的に既知の条件で行えばよい。こうして得られた麦芽糖化液をろ過した後、ホップあるいはハーブなど、香り、苦味などを付与できる原料を添加して煮沸を行ない、それを冷却することにより冷麦汁が得られる。

【0070】 また、第2の工程は、前記冷麦汁に酵母を添加して発酵させ麦芽アルコール飲料中間品を得る工程である。

【0071】 ここで、用いられる酵母は、前記麦芽の糖化によって得られた麦汁内の糖分を代謝してアルコールや炭酸ガス等を産生する、いわゆるアルコール発酵を行う酒類酵母であればいずれでもよく、具体的には、例えば、サッカロミセス・セレビシェ、サッカロミセス・ウバルム等が挙げられる。

【0072】 発酵は、上記仕込み工程で得られた麦汁を冷却し、ここに前記酵母を添加して行う。発酵条件については基本的に既知の条件と変わらず、例えば発酵温度が通常15℃以下、好ましくは8～10℃であり、発酵時間が好ましくは8～10日である。

【0073】 さらに、第3の工程は、前記発酵工程で得られた麦芽アルコール飲料中間品を貯蔵する貯酒工程である。

5 【0074】 本工程では、アルコール発酵が終了した発酵液が密閉タンクに移され、貯蔵される。貯蔵条件については基本的に既知の条件と変わらず、例えば貯蔵温度は0～2℃が好ましく、貯蔵時間が20～90日間であることが好ましい。発酵終了液を貯蔵することにより残存エキスの再発酵と熟成が行われる。

【0075】 そして、第4の工程は、前記貯酒工程で得られた麦芽アルコール飲料中間品をろ過し麦芽アルコール飲料を得るろ過工程である

10 【0076】 ろ過条件については基本的には既知の条件と変わらず、例えばろ過助材として珪藻土、PVP（ポリビニルピロリドン）、シリカゲル、セルロースパウダー等が用いられ、温度は0±1℃で行われる。

【0077】 こうして麦芽アルコール飲料が得られる。ろ過された麦芽アルコール飲料はそのまま、または無菌ろ過や加熱処理を行った後、タンク詰め、樽詰め、ビン詰めまたは缶詰めされ市場に出荷される。

15 【0078】 なお、麦芽アルコール飲料は、その製造に用いられる麦芽の使用比率の多少は特に制限されず、麦芽を原料として製造されるアルコール飲料であればよい。具体的には例えば、ビールや発泡酒が挙げられる。また、いわゆるノンアルコールビールやノンアルコール発泡酒も、ビール等の麦芽アルコール飲料と同様の製法を用いることから、麦芽アルコール飲料である。

20 【0079】 上記本発明によれば、原料中にLOX-1を含まないため、麦芽アルコール飲料の製造工程においてリノール酸から9-ヒドロペルオキシオクタデカジエン酸が生成し難くなり、したがってTHODやトランス-2-ノネナールも生成抑制が期待され、香味耐久性と泡持ちが向上した麦芽アルコール飲料を得ることが期待できる。

25 【0080】 次に、本発明の核酸及び大麦におけるLOX-1活性の存在を検出する方法について説明する。

【0081】 本発明の核酸は、配列番号11で表される塩基配列からなることを特徴とする。配列番号11は、LOX-1活性を欠失した大麦品種SBOU2が有している変異型のLOX-1のゲノム配列を表している。すなわち、本発明のLOX-1変異遺伝子は、配列番号11で表されることを特徴とする。通常
5 LOX-1遺伝子では、3178番目に相当する塩基はGであるが、変異型のLOX-1遺伝子では3178番目の塩基はAに変異している。そして、通常のLOX-1遺伝子にあっては、この塩基は第5イントロンの1番目の塩基であり、3178～3179番目の塩基配列であるGTがスプライシング供与部位に相当する（図5）。しかし、変異型のLOX-1遺伝子では、スプライシング供与部
10 位に相当する3178～3179番目の塩基配列がATであるため、スプライシング異常を起こしてスプライシングが生じなくなる。しかも、3176～3178番目の塩基配列はTGAであり終止コドンであるため、ここで翻訳が終了することになる。

【0082】 この変異型のLOX-1遺伝子から生じる変異型のLOX-1タンパク質は、第5エキソンに相当する部分までしか存在せず、通常のLOX-1
15 タンパク質と比べて第5エキソンよりもC末端側のアミノ酸残基を欠いている。分子量は、通常のLOX-1タンパク質が95Kdであるのに対して、変異型のLOX-1タンパク質は57Kdである。通常のLOX-1タンパク質における、第5イントロンの近傍のエクソン領域に相当するドメインは、植物LOXの活性
20 中心であるという知見（Shibata and Axelrod (1995) J. Lipid Mediators and Cell Signaling 12:213-228）と一致するように、変異型LOX-1タンパク質はリポキシゲナーゼ活性を欠いている。

【0083】 したがって、変異型LOX-1遺伝子を有する大麦を原料にして、
25 麦芽アルコール飲料を製造すれば、原料中にLOX-1タンパク質を含まないため、麦芽アルコール飲料の製造工程においてリノール酸から9-ヒドロペルオキ

シオクタデカジエン酸が生成し難くなり、したがってTHODやトランス-2-
ノネナールも生成抑制が期待され、香味耐久性と泡持ちが向上した麦芽アルコール
飲料が得られる。このように、香味耐久性と泡持ちが向上した麦芽アルコール
飲料を得る上で、本発明の配列番号11で表される塩基配列からなる核酸は非常
5 に有用である。

【0084】 本発明の核酸は、また、配列番号11で表される塩基配列からな
る核酸において、3178番目の塩基を含む10～60の連続した塩基配列から
なる核酸を提供する。この核酸をプローブとして用いることで、大麦の有するL
OX-1遺伝子が正常型か変異型かを見分けることが可能である。つまり、正常
10 型のLOX-1遺伝子の3178番目の塩基はGであることから生じるミスマッ
チを利用して、ハイブリダイゼーションの違いから正常型か変異型かを見分ける
ことが可能である。例えば、この核酸とLOX-1遺伝子の核酸とのハイブリッ
ドを形成させ、徐々に温度を上昇させることによりハイブリッドの融解温度を測
定すれば、正常型LOX-1遺伝子と変異型LOX-1遺伝子とでは示す融解温
15 度が異なるため、容易に両者を見分けることが可能である。その他、当業者にと
って公知の方法により、この核酸を利用してLOX-1遺伝子の型（正常型／変
異型）を見分けることが可能である。特異性の観点から、この核酸は、3178
番目の塩基を含む20～50の連続した塩基配列からなること、また、3178
～3181番目の塩基を含んでいることが好ましい。さらに、この核酸は、蛍光
20 物質や放射性同位元素等で標識されていてもよい。

【0085】 本発明の大麦におけるLOX-1活性の存在を検出する方法は、
大麦サンプルからゲノムを単離する工程と、配列番号11で表される塩基配列の
3178番目の塩基を検出し、その塩基の存在を当該大麦のLOX-1活性の存
在の指標とする工程と、を含むことを特徴とする。かかる方法によれば、検査対
25 象の大麦がLOX-1活性欠失形質を有するか否かを見分けることが可能となる。

【0086】 大麦サンプルは、大麦種子に限らず、葉、茎、根等を用いること

が可能である。核酸の単離は公知の方法で行うことが可能であり、例えば、CTAB法やEthidium bromide法などを利用することができる。

【0087】 また、配列番号11で表される塩基配列の3178番目の塩基の検出は、当業者にとって公知の方法により行うことが可能である。例えば、必要に応じて、PCR法等の核酸増幅方法により、配列番号11で表される塩基配列の3178番目の塩基を含む核酸を増幅する。単離した核酸又は増幅した核酸断片に対して、例えば、上述したように、配列番号11で表される塩基配列からなる核酸において3178番目の塩基を含む10～60の連続した塩基配列からなる核酸を用いることにより、3178番目の塩基の種類を判別することが可能である。

【0088】 しかしながら、LOX-1遺伝子の3178～3181番目の塩基の違いを利用して3178番目の塩基を検出する方法が、より簡便で効率がよい。3178～3181番目の部位は、正常型のLOX-1遺伝子では制限酵素AfaI/RsaIの切断部位となっているのに対して、変異型のLOX-1遺伝子では3178番目の塩基がAであるために、制限酵素AfaI/RsaIの切断部位ではない(図5)。つまり、単離した核酸又は増幅した核酸断片をAfaI/RsaIで制限酵素処理を施すと、正常型LOX-1の核酸は切断されるのに対して、変異型LOX-1の核酸は切断されない。制限酵素処理を行った核酸サンプルを電気泳動で分析すれば、泳動パターンの違いにより、LOX-1遺伝子の型(正常型/変異型)を見分けることが可能であり、3178番目の塩基の種類を判別することが可能である。また、その他、3178～3181番目の塩基を含む10～60の連続した塩基配列からなる核酸をプローブとして用いて、制限酵素処理を行った核酸とハイブリダイズ等させることにより、LOX-1遺伝子の型を見分けることも可能であり、3178番目の塩基の種類を判別することが可能である。

【0089】 このようにして3178番目の塩基を判別した結果、塩基がGで

あれば検査対象の大麦はLOX-1活性を有していることになり、香味耐久性と泡持ちを向上させた麦芽アルコール飲料の原料には適していないと判断できる。一方、塩基がAであれば検査対象の大麦はLOX-1活性を有していないことになり、香味耐久性と泡持ちを向上させた麦芽アルコール飲料の原料には適していると判断できる。

【0090】 また、本発明の核酸は、配列番号10の1～1554番目の塩基で表される塩基配列からなることを特徴とする。配列番号10は、LOX-1活性を欠失した大麦品種SBOU2に発現している変異型のLOX-1のcDNA配列を表している。そのうち、1～1554番目の塩基で表される塩基配列がコード領域である。既に述べたように、このcDNAがコードする変異型LOX-1タンパク質は、通常のLOX-1タンパク質に比べて第5エキソンよりもC末端側のアミノ酸残基を欠いており、その分子量は57Kdであり、さらに、リボキシゲナーゼ活性を欠いている。

【0091】 したがって、この核酸を発現している大麦を原料にして、麦芽アルコール飲料を製造すれば、上述したように、香味耐久性と泡持ちが向上した麦芽アルコール飲料が得られる。

[実施例]

【0092】 以下、実施例により本発明の内容をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

【0093】 探索試験1 (LOX-1酵素活性測定によるLOX-1欠失大麦の探索)

【0094】 以下の方法によりLOX-1酵素活性測定を行い、大麦遺伝資源の中からLOX-1欠失大麦の探索を行った。

【0095】 まず、以下の方法により大麦種子より粗酵素液を抽出した。完熟大麦種子1粒をハンマーで破碎し、500 μ Lの抽出バッファー(0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5))を用いて、4℃で30分間振とうして抽出し

た。得られた抽出液を15000rpmで10分間遠心分離した後、上清を粗酵素液とした。

【0096】 次に、粗酵素液10 μ Lに5 μ Lの基質液（40mMリノール酸、1.0%（W/V）Tween20水溶液）及び85 μ Lの抽出バッファーを加え混和した後、24℃で5分間反応させた。反応の停止は、100 μ Lの反応停止液（80mM 2, 6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール メタノール溶液）を添加し混和することで行った。反応液を-20℃で30分間静置した後、3000rpmで20分間遠心分離し、上清を次の発色反応に用いた。得られた上清20 μ Lに、200 μ Lの発色液（4mM 2, 6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール、25mM硫酸、0.25mM硫酸アンモニウム鉄（II）6水和物、100mMキシレノールオレンジ、90%メタノール水溶液）を添加し、30分間静置後、波長550nmの吸光度を測定した。なお、陰性対照としては、粗酵素液を100℃で5分間熱処理し、LOX-1を失活させたものを同様に反応させたものを用い、陽性対照として大麦品種Kendallの種子の粗酵素液を用いた。

【0097】 遺伝資源の探索の結果、図1に示すように、SBOU2の種子には有意なLOX-1活性が認められないことが判明した。このSBOU2は在来種であることから、人為的に突然変異誘発を施した系統ではなく自然突然変異体である。

【0098】 証明試験1 （SBOU2粗酵素液にLOX-1阻害活性のないことの確認）

【0099】 次に、SBOU2粗酵素液のLOX-1阻害活性の有無について調べた。

【0100】 LOX-1活性を示す粗酵素液（陽性対照：PC）にSBOU2の粗酵素液（10 μ L、20 μ L、50 μ L）を添加してLOX-1活性の変化を調べたところ、SBOU2の粗酵素液の添加によってもLOX-1活性は変化せず、SBOU2粗酵素液にLOX-1阻害活性は認められなかった（図2）。こ

ことから、SBOU2のLOX-1活性欠失の原因はLOX活性阻害物質によるものではないと考えられる。

【0101】 証明試験2 (SBOU2種子中のLOX-1タンパク質発現量の確認)

5 【0102】 次に、抗LOX-1抗体を用いて、SBOU2の種子にLOX-1タンパク質が発現しているか否かを調べた。

10 【0103】 まず、抗LOX-1抗体の作成を行った。抗原として用いたLOX-1タンパク質は、大腸菌で発現させたLOX-1タンパク質を精製することで得た(Kuroda et. al. (2002) J. Bioscience and Bioengineering 93:73-77)。精製したタンパク質をウサギに免疫し、LOX-1抗体を作製した。本抗体は、LOX-1およびLOX-2を認識する。

15 【0104】 次に、以下の方法でウェスタンブロッティングを行い、SBOU2の種子におけるLOX-1タンパク質の発現について調べた。SBOU2から0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5)を用いて抽出した全可溶性タンパク質3 μ gを、SDSポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)により分画後、PVDFメンブレン(ミリポア社)にブロッティングした。このメンブレンをTTBS(20mM Tris-HCl(pH7.5)、0.15M 塩化ナトリウム、0.05%(w/v) Tween20、0.05%(w/v) アジ化ナトリウム))で洗浄後、LOX-1抗体液(1000倍希釈/TTBS)で30分間反応させた。メンブレンのTTBS洗浄を5分3回行った後、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体液(Santa Cruz社製、1000倍希釈TTBS溶液)で30分間反応させた。メンブレンをTTBSで5分間 \times 2回洗浄を行い、さらにAP9.5(10mM Tris-HCl(pH9.5)、0.1M 塩化ナトリウム、5mM 塩化マグネシウム)で5分 \times 1回洗浄を行った後、アルカリフォスファターゼ基質液(1mg/ml ニトロブ

20

25

ルーテトラゾリウム、0.5 mg/ml BCIP、AP 9.5 溶液) と反応させ発色させた。その結果、対照品種 (Kendall) では約 95 Kd の分子量を持つ強いバンドが得られたのに対して、SBOU2 系統種子では約 95 Kd および約 57 Kd の分子量領域に非常に薄いバンドが検出された (図 3A)。

5 【0105】 また、この抽出サンプルを、Phast System (Amersham Pharmacia 社製) を用いて、等電点電気泳動 (IEF、pI 3-9) を行った後、同様にウェスタン解析した。その結果、SBOU2 では、LOX-2 の pI の位置にバンドが検出されたが、LOX-1 の pI の位置には明瞭なバンドは認められなかった (図 3B)。このことから、SBOU2 の種子抽出タンパク質で認められた約 95 Kd のバンドは、LOX-2 タンパク質である
10 と考えられる。

【0106】 以上の結果から、SBOU2 の種子には、正常な LOX-1 タンパク質がほとんど発現していないことが確認された。

【0107】 証明試験 3 (SBOU2 の種子の LOX-1 RNA の解析)

15 【0108】 SBOU2 の登熟約 4 週間目の種子および発芽 3 日目の種子から抽出した全 RNA を鋳型として RT-PCR を行った。反応は市販のキット (ロシュダイアグノスティック社製、パーキンエルマー社製) を用いて、キットのマニュアルに従い行った。プライマーは既報の配列 (DNA データバンク : アクセス
20 ション L35931) をもとに、5'-GGAGAGGAGGCCAAGAAC AAGATG-3' (配列番号 3) 及び 5'-GGTTGCCGATGGCTTAG AT-3' (配列番号 4) に設計した。PCR は、94℃ 2 分を 1 回、94℃ 1 分、60℃ 2 分、72℃ 4 分の反応を 31 回繰り返した後、72℃ で 7 分の伸長反応を行った。

25 【0109】 増幅された DNA を電気泳動したところ、対照 (品種 Kendall) より若干増幅量が少ないものの、登熟中および発芽中の RNA に対して、約 2.5 Kb のバンドの増幅が検出された (図 4)。このことは、LOX-1 遺伝

子が正常に転写されていることを示している。

【0110】 以上、SBOU2の種子において、(1)LOX-1活性が認められなかったこと、(2)LOX-1抗体に反応する抗原タンパク質が微量にしか存在しなかったこと、(3)約57Kdの分子量のタンパク質の存在が認められたこと、(4)LOX-1のmRNAが認められたことなどから、SBOU2のLOX-1活性が欠失しているメカニズムは、転写以降の異常によると考えられる。

【0111】 証明試験4 (SBOU2のLOX-1遺伝子イントロン領域の構造解析)

【0112】 LOX-1遺伝子のイントロンおよびエクソン領域の構造を解析するため、全エクソンを含む領域のゲノムDNAを単離した。鋳型にはSBOU2の全DNAを用いた。プライマーは既報の配列 (DNAデータバンク: アクセション U83904, L35931) をもとに、設計した (5'-CACGTCGCCGTCCGATCCATC-3' (配列表配列番号5)、5'-GGTTGCCGATGGCTTAGAT-3' (配列表配列番号4))。PCRは、94℃1分、65℃2分、72℃3分の反応を31回繰り返した後、72℃で7分の伸長反応を行った。得られたDNA断片をpCR2.1にクローニングし (pGLXABAL1)、構造解析の鋳型とした。構造解析はABI社のシーケンサーを用い、シーケンス反応はダイターミネーター法を用いた。全構造は配列表の配列番号11に示した。

【0113】 配列表の配列番号1は、既報のLOX-1遺伝子の塩基配列 (WO 02053721) のうち、第5イントロンがある領域の構造を示した。スプライシングの供与部位は60-61番目の塩基配列5'-GT-3'である。

【0114】 一方、解析の結果から分かったSBOU2の対応する領域の塩基配列を配列番号2に示した。SBOU2では、スプライシング供与部位である60番目のグアニンがアデニンに変異していることが明らかになった。

【0115】 また、配列番号2の60番目の塩基がアデニンに置換されている

ことにより、終止コドンが新たに形成され（配列表の配列番号2の58-60番目の塩基配列5'-TGA-3'）、スプライシング部位の5'上流への変化が生じていない場合にはLOX-1タンパク質の翻訳はここで終了すると考えられる（図5）。

5 【0116】 第5イントロンの近傍のエクソン領域は、植物LOXの活性中心であることが知られており（Shibata and Axelrod (1995) J. Lipid Mediators and Cell Signaling 12:213-228）、上記スプライシング異常は、LOX-1酵素活性に大きな影響を及ぼすと考えられる。

10 【0117】 証明試験5 （第5イントロンにおけるスプライシングの解析）

【0118】 第5イントロンにおいて実際にスプライシング異常が起こっていることを確認するためにRT-PCRによる解析を行った。

15 【0119】 発芽中のSBOU2およびKendallから全RNAを抽出し、市販のキット（ロシュダイアグノスティック社製）を用いてcDNAを合成し鋳型DNAとした。ゲノムDNAにおいて、増幅断片が第3イントロン（106bp）、第4イントロン（132bp）および第5イントロン（79bp）を含むように設計した2種のプライマー（5'-CCATCACGCAGGGCATCC TG-3'（配列表配列番号6）、5'-GCGTTGATGAGCGTCTGCCG-3'（配列表配列番号7））を用いてPCRを行った。PCRは、94℃1
20 分、65℃2分、72℃3分の反応を31回繰り返した後、72℃で7分の伸長反応を行った。増幅したDNA断片をアガロースゲル電気泳動したところ、SBOU2の増幅断片は、Kendallの増幅断片より約80bp塩基数が大きかった（図6A）。なお、SBOU2のゲノムDNAに対しては約1.2Kbの断片が増幅されており、上記RT-PCRの結果は、発現しているRNAに対する結果であると考えられる。

25 【0120】 次に、第3イントロン（106bp）、第4イントロン（132b

p) および第5イントロン (79bp) のいずれのイントロンがスプライシング異常をおこしているか調べるために、上記増幅断片を第4イントロン (132bp) と第5イントロンの間のエクソン領域に存在する制限酵素 *StuI* 部位で消化した。その結果、第5イントロンを含むDNA断片は、ゲノムDNAの増幅断片の移動度と等しいことから、第5イントロンのスプライシングが異常をおこし、スプライシングされないか、あるいはスプライシング部位が3'側にずれていることが明らかになった (図6B)。すなわち、図5で示した新たにできた終止コドンにより、SBOU2のLOX-1タンパク質の翻訳はこのコドンで終了し、LOX-1活性が失われていることが明らかになった。

10 【0121】 証明試験6 (SBOU2のLOX-1 cDNAの構造解析)

【0122】 SBOU2由来のLOX-1の構造を明らかにするため上記と同様な方法でcDNAを単離した。増幅は、*BamHI* 部位と開始コドン含むプライマー (5'-GGATCCATGCTGCTGGGAGGGCTG-3' (配列番号8)) 及び *HindIII* 部位と終止コドンとを含むように設計したプライマー (5'-AAGCTTTTAGATGGAGATGCTGTTG-3' (配列番号9)) を用いた。増幅した断片は、pT7 Blue T-Vector (Novagen) にクローニングした後 (pBDC1)、構造解析した。構造解析の結果、得られたcDNAの塩基配列を配列番号10に示す。本cDNAクローンは、第5イントロン全領域 (配列番号10の1554番目から1632番目) を含むことが明らかになった。

20 【0123】 証明試験7 (大腸菌の形質転換と発現誘導)

【0124】 大腸菌において、SBOU2と、野生型LOX-1を保有する品種 *Streptococcus* 由来のLOX-1を発現させるため、*Streptococcus* 由来cDNAも上記と同様に単離し、クローニングした (pSDC1)。pSDC1及びpBDC1の両クローンから *BamHI*-*HindIII* 断片をそれぞれ切り出し、大腸菌発現ベクター pQE80L (Qiagen) の *BamHI*-*HindIII* 部位に得られた断片をそれぞれ挿入し、大腸菌発現ベクターとした (pSQE1 (S

25

t e p t o e の cDNA を挿入)、p B Q E 1 (S B O U 2 の cDNA を挿入))。これらのベクターを大腸菌 J M 1 0 9 に形質転換後、Qiagen 社のマニュアルに従い、I P T G による発現誘導を行った。その結果、p S Q E 1 / J M 1 0 9 では約 9 5 K d のバンドが発現誘導されたのに対し、p B Q E 1 / J M 1 0 9 では約 5 7 K d のバンドが発現誘導された (図 7)。また、これらの大腸菌を超音波により破碎後、粗酵素液を抽出し L O X 活性を測定した。その結果、p S Q E 1 / J M 1 0 9 では高い L O X 活性が認められたのに対し、p B Q E 1 / J M 1 0 9 では L O X 活性は認められなかった (図 8)。これらの結果は、S B O U 2 の植物体における L O X - 1 活性及び L O X - 1 タンパク質の解析結果と全く一致し、大腸菌において S B O U 2 の L O X - 1 欠失を再現できることを示している。

【 0 1 2 5 】 証明試験 8 (交換挿入及び発現実験)

【 0 1 2 6 】 次に、p B Q E 1 の第 5 イントロンスプライシング供与部位の変異を含む P s t I - S t u I 断片 (S t u I 部位は配列番号 1 0 の 1 5 0 2 ~ 1 5 0 7 番目の塩基、P s t I 部位は配列番号 1 0 の 2 0 4 8 ~ 2 0 5 3 番目の塩基) を、野生型である p S Q E 1 の P s t I - S t u I 断片と互いに交換挿入し (p S Q E 1 + B P S 、 p B Q E 1 + S P S) 、上記と同様に大腸菌における発現誘導を行った。その結果、p S Q E 1 に p B Q E 1 由来の第 5 イントロンスプライシング供与部位の変異を含む P s t I - S t u I 断片を交換挿入した p S Q E 1 + B P S / J M 1 0 9 では、p B Q E 1 / J M 1 0 9 と同様に、約 5 7 K d のタンパク質が誘導され (図 7)、L O X 活性を失っていた (図 8)。逆に、p B Q E 1 に、p S Q E 1 由来の P s t I - S t u I 断片を交換挿入した p B Q E 1 + S P S / J M 1 0 9 では、p S Q E 1 / J M 1 0 9 と同様に、約 9 5 K d のタンパク質が誘導され (図 7)、L O X 活性が復活した (図 8)。なお、p B Q E 1 の P s t I - S t u I 断片の塩基配列は、野生型 L O X - 1 遺伝子と第 5 イントロンスプライシング供与部位以外は全く同一であった (配列番号 1 0 の 1 5 5 4 番目の G が A)。以上の結果から、S B O U 2 の第 5 イントロンスプライシング供与

部位の変異の有無が、LOX-1活性の有無を決定していることが明らかとなった。

【0127】 証明試験 9 (第5イントロン変異を用いた大麦交配系統のマッピングと選抜)

- 5 【0128】 既報のLOX-1塩基配列においては、第5イントロンのスプライシング供与部位を含む配列は(配列表配列番号1の60-63番目: 5'-GTAC-3'), GTAC配列を認識する制限酵素AfaI (RsaI)で消化できる。一方、SBOU2系統では、この領域の配列に変異があり(配列表配列番号2の60-63番目: 5'-ATAC-3'), AfaIおよび/あるいはRsaI
- 10 Iで消化できなくなっていること(図5)を利用して、LOX-1欠失遺伝子のマッピングを行った。大麦品種KendallとSBOU2の雑種第2世代(F2) 144個体の葉からDNAを抽出し、増幅断片がこのAfaI部位を含むように設計した2種のプライマー(5'-CCATCACGCAGGGCATCC
- 15 TG-3' (配列表配列番号6), 5'-GCGTTGATGAGCGTCTGCG-3' (配列表配列番号7))を用いて、PCRを行った。PCRは、94℃ 1分、65℃ 2分、72℃ 3分の反応を31回繰り返した後、72℃で7分の伸長反応を行った。増幅された断片をAfaIで切断し、2.5%アガロースゲル電気泳動で分析した(以上をAfaI法と呼ぶ)。その結果、SBOU2型、Kendall型、およびヘテロ型を容易に見分けることが出来た(図9)。AfaI
- 20 法多型調査に加え、LOX-1遺伝子が座乗している大麦4H染色体のLOXA遺伝子座近傍のDNAマーカー(JBC970)についても、各系統の多型調査を行った(図10)。

- 25 【0129】 次に、このF2個体に実った種子を用いて、種子LOX活性を調査した。LOX活性が認められない系統については、さらに複数種子(4~7粒)の活性測定を行った(図10)。

【0130】 以上のF2世代のAfaI法多型調査とF3種子のLOX活性測

定の結果、SBOU2のLOX-1欠失形質の分離は上記AfaI法多型の分離と完全に一致した。すなわち、SBOU2のLOX-1欠失遺伝子がLOXA遺伝子座にあることが、これら一連の遺伝学的調査から明らかとなった。

【0131】 また、この結果は、DNA変異を利用した大麦選抜法の1例であるAfaI法を用いれば、LOX-1欠失の交配系統を大麦成育初期の葉の段階で選抜でき、種子が実るのを待つ必要はないことを示している。

【0132】 実施例1 (他的大麦品種のAfaI多型調査)

【0133】 一般的な大麦品種／系統を用いて、AfaI法多型調査を行った。用いた品種は、ミカモゴールドン、ゴールドンメロン、はるな二条、みょうぎ二条、さきたま二条、ワセドリ二条、あぐりもち、ハルピン二条、りょうふう、北育33号、北育35号、Prior、Schooner、Sloop、Lofty Nijo、Franklin、Betzes、Harrington、Manley、B1251、CDC Kendall、CDC Stratus、CDC Copeland、Hanna、Merit、AC Metcalfe、TR145、Chariot、Stirling、Proctor、Koral、Heartland、計32品種／系統である。AfaI法多型調査の結果、供試したこれらの品種はSBOU2型ではなく、第5イントロンのスプライシング供与配列を含む制限酵素AfaI部位(配列表配列番号1の60-63番目:5'-GTAC-3')が消化されていた(図11)。このことは、これら育成系統において、AfaI部位(配列表配列番号1の60-63番目:5'-GTAC-3')にDNA変異が認められないことを示すものであり、交配系統のLOX-1欠失遺伝子の選抜に、このAfaI法が有効に利用できる。

【0134】 実施例2 (遺伝資源の探索)

【0135】 岡山大学保存の世界の大麦遺伝資源(在来種)についてAfaI法による調査を行った。その結果、新たな5系統において、第5イントロンのスプライシング供与配列を含む制限酵素AfaI部位(配列表配列番号1の60-

63番目：5' -GTAC-3'）が消化されない系統を見出した（岡山大学保存SBOU1、SBOU3、SBOU4、SBOU5およびSBOU6）（図12）。

【0136】 次に、これらの系統の種子のLOX-1活性を探索試験1に記載の方法で測定した。なお、SBOU5およびSBOU6については活性測定を反応5分で行い（図13A）、SBOU1、SBOU3およびSBOU4についてはより活性の有無を明確にできるよう反応時間を90分にのばして活性測定した（図13B）。その結果、これらの全ての系統において有意な活性は認められなかった（図13）。

【0137】 このことから、SBOU2ならびにSBOU1、SBOU3、SBOU4、SBOU5およびSBOU6（SBOU2型LOX-1欠失大麦）はLOX-1欠失大麦であることが明らかとなった。これらの系統はいずれも、在来種であり、人為的に変異誘発を行った系統ではないことから、LOX-1遺伝子に関して自然突然変異体である。

【0138】 以上の結果から、DNA変異を利用した大麦選抜法の1例であるAfaI法は、LOX-1欠失大麦交配後代系統の選抜のみならず、大麦遺伝資源からでも効率的にLOX-1欠失大麦の選抜を可能にする技術であることが明らかとなった。

【0139】 実施例3 （試験醸造用大麦の育成）

【0140】 大麦品種大正麦とSBOU2を交配し、得られた雑種第1代（F1）を自殖して得られるF2世代において、上記探索試験1に記載のLOX-1酵素活性測定法および上記証明試験9に記載の上記AfaI法によりLOX-1欠失形質を確認し、LOX-1欠失系統群、LOX-1保有系統群を集団として、以降の種子増殖に供試した。

【0141】 種子増殖は各系統（集団）ごとに行い、F4種子が得られるまで均一な圃場あるいは温室を用いて行った。F4種子についてLOX-1酵素活性を測定したところ、F2個体で判別されたLOX-1活性の有無を維持しており、

この結果からLOX-1欠失形質は安定して後代に伝達されることが明らかになった。

【0142】 以降の麦芽製造試験および麦芽アルコール飲料製造試験には、このF4種子を供試した。

5 【0143】 実施例4 (試験醸造用麦芽の製造)

【0144】 上記大正麦×SBOU2の交配に由来する、LOX-1活性を有しない大麦種子からなるLOX-1欠失大麦F4集団(LOX-F4)と、LOX-1を有する大麦種子からLOX活性保有大麦F4集団(LOX+F4)をつくり、製麦に用いた。

10 【0145】 製麦は、Automatic Micromalting System (Phoenix Systems社製)を用いて、浸麦16℃合計82時間(5時間WET/7時間DRYサイクル)、発芽15℃139時間、焙燥29時間(55℃13.5時間、65℃8時間、75℃3.5時間、83℃4時間)の条件で行った。

15 【0146】 実施例5 (麦芽及び麦汁の分析)

【0147】 麦芽の分析は、EBC標準法(European Brewery Convention 編、Analytica EBC (4th Ed)、1987)に従い行った。その結果、LOX-F4とLOX+F4を用いた麦芽には麦芽分析値に大きな差がなく、LOX-1活性の有無を比較する目的の麦芽アルコール飲料醸造に問題なく使用できることが明らかになった(図14)。

20 【0148】 次に、麦芽50gを用いて、コングレス法(European Brewery Convention 編、Analytica EBC (4th Ed)、1987)により麦汁を作製し、麦汁中の脂質酸化物を分析した。

25 【0149】 まず、麦汁中のトランス-2-ノネナール量を以下の方法で測定した。麦汁サンプル8mLにバイアルに入れ、3gのNaClを添加しキャップをした。次にスペルコ製ポリジメチルシロキサンSPMEファイバーを挿入し、

40℃で15分間インキュベートした後、ガスクロマトグラフィーに供試した。

【0150】 ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーは、キャピラリーカラムとしてJ&W社製DB-1 (30m X 0.25mm, フィルム厚1 μ m)を、キャリアガスとしてヘリウム (1mL/分) を用い、オープン条件は60℃から225℃ (5℃/分) とし、セレクトイオンモード (m/z : 70) でトランス-2-ノネナールの定量を行った。なお、定量には、シグマ社製トランス-2-ノネナールを標準品とした標準添加法を用いた。

【0151】 その結果、LOX-F4、LOX+F4を用いて作製した麦汁のトランス-2-ノネナール濃度はそれぞれ0.36ppbと3.85ppbであった。したがって、本発明にかかる麦芽を使用して麦汁を製造すれば、従来の麦芽をした場合に比べて、トランス-2-ノネナール生成量を1/10以下に抑制できることが明らかとなった。

【0152】 また、麦汁ノネナールポテンシャルは以下の方法で測定した。まず、Drostらの方法(Drost, B. W., van den Berg, R., Freijee, F. J.M., van der Velde, E. G., and Hollemans, M., J. Am. Soc. Brew. Chem., 48, 124-131, 1990)により麦汁を2時間煮沸した。その後、上記トランス-2-ノネナールの測定方法に従いサンプル中のトランス-2-ノネナールの量を測定し、麦汁中のノネナールポテンシャルを算出した。

【0153】 その結果、LOX-F4、LOX+F4を用いて作製した麦汁のノネナールポテンシャルは、それぞれ2.74ppbと11.9ppbであった。ノネナールポテンシャルは製品老化を予測できる指標として知られることから(Drost, B. W., et al., J. Am. Soc. Brew. Chem., 48, 124-131, 1990、Ueda et al. (2001) EBC-proceedings 55: p3 28th Congress)、本発明にかかる大麦から作製した麦芽を利用し、麦芽アルコール飲料を醸造すれば、麦芽アルコール飲料の香味耐久性を大きく改善する事が出来る。

【0154】 また、LOX-F4を用いて作製した麦汁のトランス-2-ノネナール濃度とノネナールポテンシャルを、市販の麦芽を用いて作製した麦汁のそれらと比較したのが図15である。図15に示した結果から明らかなように、本発明にかかる麦汁は、従来の大麦では達成できなかった分析値を示した。

5 【0155】 以上の結果から、本発明にかかる大麦を利用すれば、従来品にはない品質を有する麦芽を製造する事が出来ることが明らかとなった。

10 【0156】 さらに、麦汁中のTHOD濃度を高速液体クロマトグラフィー質量分析にて測定した。高速液体クロマトグラフィーの条件は以下の通りである。移動相の流速0.3mL/分とし、移動相には0.5%酢酸（A液）とアセトニトリル（B液）の混合液を用い、A液：B液＝35：65（0分）－A液：B液＝5：95（30分）のリニアグラジエントの条件で行った。また、カラムはウォーターズ社製 Assymetry (No.106005; C18, 3.5 μ m: 2.1x150mm)を用い、カラム温度は50℃とし、ヒュレットパッカード社製 1100 型高速液体クロマトグラフシステムを用いて、5 μ Lの麦汁または麦芽アルコール飲料サンプルを分離
15 した。質量分析はウォーターズZQを用い、ESイオン化ネガティブモードで質量329をモニタリングした。なお、THODの標準液はビール抽出サンプルを利用した（Kobayashi, N., et al., J. Biosci. Bioeng., 90, 69-73, 2000）。

20 【0157】 その結果、LOX-F4、LOX+F4を用いて作製した麦汁のTHOD濃度はそれぞれ6.5ppmと14.7ppmであり、本発明にかかる麦芽を使用して麦汁を製造すれば麦汁THOD濃度を1/2以下に抑制できることが明らかとなった。

25 【0158】 前述したようにTHODは仕込工程において麦芽LOX-1と麦芽ペルオキシゲナーゼ様活性の働きによりリノール酸から変換されることにより生成するが、麦芽ペルオキシゲナーゼ様活性がTHOD生成の律速段階と考えられるため（Kuroda, H., et al., J. Biosci. Bioeng., 93, 73-77, 2002）、麦芽LOX-1活性を低下させた場合、THODの生成がどの程度抑制されるかは明らかで

はなかった。しかし、本実施例の結果からLOX-1活性のない大麦種子から製造される麦芽を使用すれば、麦汁中のTHOD量が減少する事が証明された。THODは酵母によって代謝されること無く最終製品に移行する事から
(Kobayashi, N., et al., J. Inst. Brew., 106, 107-110 (2000))、本発明にかかる大
5 麦由来の麦芽を利用すれば、香味品質や泡品質の良い麦芽アルコール飲料の製造
が可能となることが明らかとなった。

【0159】 実施例6 (麦芽アルコール飲料試験醸造)

【0160】 1. 冷麦汁の製造と分析

【0161】 上記実施例4で得られたLOX-F4麦芽とLOX+F4麦芽の
10 2点について、50Lスケール仕込設備により発泡酒仕様(麦芽使用率24%)
での仕込を行なった。仕込条件は以下の通りである。

【0162】 各々の麦芽1.5kgを単用で15Lの仕込用水により50℃、
20分→65℃、30分→75℃、3分のダイアグラムに従って仕込み、ロイタ
ー設備により麦汁ろ過を行ない、最終的に35Lのろ過麦汁を得た。

【0163】 得られたろ過麦汁は液糖(糖分75%)5kgと混合し、ホップ
15 ペレット(苦味分析値87.0BU(EBC))13gを添加して70分間煮沸し、
10℃まで冷却し、加水によるエキスイ調整によりエキスイ含量11.6~11.8%
の冷麦汁とした。

【0164】 得られた冷麦汁の分析は、EBC標準法(European Brewery
20 Convention 編、Analytica EBC (4th Ed)、1987)に従い行った。分析値を表1に
示した。表1に記載したように、一般的な分析項目に関してはLOX-F4とL
OX+F4の間で明らかな差は認められなかった。

【0165】

〔表 1〕

品種	LOX+F4	LOX-F4
比重	1.0475	1.0467
エキス (%)	11.78	11.60
真性非発酵エキス (%)	3.45	3.38
真性最終発酵度 (%)	70.7	70.9
仮性非発酵エキス (%)	1.54	1.52
仮性最終発酵度 (%)	86.9	86.9
pH	5.88	5.93
色度 (° EBC)	2.1	2.1
BU	31.2	27.3
全窒素 (mg/100mL)	24	22
ポリフェノール (mg/L)	44	48
FAN (mg/L)	46	51

【0166】 2. 麦芽アルコール飲料（発泡酒）の製造

5 【0167】 上記1で得られた冷麦汁を蒸気殺菌した30Lスケールのシリン
ドコニカル型タンクに移し、初期濃度3000万cells/mLとなるよう
に酵母を添加し、13℃にて主発酵を行なった。発酵液のエキスが2.5%まで
切れた段階で同型のタンクに移し替え、貯酒工程を行った。貯酒工程は最初の6
日間は13℃にて、その後の2週間は0℃にて行った。

10 【0168】 貯酒工程の終わった発酵液は、ビールろ過設備及び充填設備にて、
麦芽アルコール飲料をろ過し、壺への充填を行なった。

【0169】 3. 麦芽アルコール飲料の分析

【0170】 上記2で得られた麦芽アルコール飲料の分析を以下のように行っ
た。

15 【0171】 まず、EBC標準法に従い分析を行ったところ、脂質酸化物分析
値以外の一般分析値に関してはLOX-F4とLOX+F4の間で、明らかな差
は認められなかった（表2）。

【0172】

[表 2]

品種	LOX+F 4	LOX-F 4
比重	1.00562	1.00565
原麦汁エキス (%)	11.82	11.56
真性エキス (%)	3.43	3.38
真性発酵度 (%)	71.0	70.7
仮性エキス (%)	1.44	1.45
仮性発酵度 (%)	87.8	87.4
アルコール (vol%)	5.50	5.35
アルコール (w/w%)	4.33	4.21
pH	3.51	3.28
ガス圧 (20℃) kg/cm ²	2.35	2.55
色度 (° EBC)	1.5	1.7
全窒素 (mg/100mL)	16	19
BU	11.6	9.5
ポリフェノール (mg/L)	45	43
FAN (mg/L)	10	12

【0173】 次に以下の方法により上記2で得られた麦芽アルコール飲料の泡持ちについて分析を行った。

- 5 【0174】 泡持ち分析は、NIBEM法を利用した。Haffmans社のFOAM STABILITY TESTERを使用し、泡持ちを分析したところ(表3)、LOX-F 4大麦はLOX+F 4大麦に比べて、NIBEM値が21ポイント高く、高い泡持ちを有する事が明らかとなった。

- 10 【0175】 また、上記実施例5に記載した方法により、THOD濃度を測定した結果、LOX-F 4はLOX+F 4に比べ半分以下に減少していた(表3)。

【0176】 以上の結果から、本発明の麦芽アルコール飲料製造方法により製造される麦芽アルコール飲料は、THODの蓄積を抑制することができ、製品の泡持ちを改善できたことが明らかとなった。

【0177】

[表 3]

品種	LOX+F 4	LOX-F 4
NIBEM	239	260
THOD (mg/L)	3.6	1.7

【0178】 次に、以下のように13人のパネルによる官能検査を行い、上記2で得られた麦芽アルコール飲料の香味耐久性を比較した。

- 5 【0179】 まず、LOX-F 4及びLOX+F 4の麦芽アルコール飲料を37℃で1週間保存した。次に、それを通常の飲用温度でコップに注いだものをパネルの官能検査に供し、老化臭、総合老化度(老化臭、老化味を加味して評価)の2項目について0～4までの評点(老化が進むほど評点が高い)で評価した(表4 A、B)。

- 10 【0180】 その結果、老化臭に関しては、13人中10人がLOX-F 4の方に低い評点をつけており、LOX-F 4はLOX+F 4と比べて、低い評点(平均値)を示した。その差はt検定により5%の危険率で有意であると判定された(表4 A)。

- 15 【0181】 また、総合老化度に関しては、13人中11人がLOX-F 4の方に低い評点をつけており、LOX-F 4はLOX+F 4と比べて、低い評点(平均値)を示し、その差はt検定により5%の危険率で有意と判定された(表4 B)。

【0182】 以上の官能検査と統計分析により、LOX-F 4はLOX+F 4と比べて、老化臭が低減され、低い総合老化度を有することが明らかとなった。

【0183】

[表 4 A]

老化臭	LOX+F4	LOX-F4
パネリスト 1	3	2
パネリスト 2	1	2
パネリスト 3	3	2
パネリスト 4	2.5	2.5
パネリスト 5	2	2
パネリスト 6	2.5	2
パネリスト 7	2.5	1.5
パネリスト 8	2.5	1
パネリスト 9	1	0.5
パネリスト 10	2.5	2
パネリスト 11	2	1.5
パネリスト 12	2.5	2
パネリスト 13	2	1.5
平均	2.2	1.7

[表 4 B]

総合老化度	LOX+F4	LOX-F4
パネリスト 1	2.5	2
パネリスト 2	1	2
パネリスト 3	3	2
パネリスト 4	3	2.5
パネリスト 5	2.5	2
パネリスト 6	2.5	2
パネリスト 7	2.5	1.5
パネリスト 8	2.5	1.5
パネリスト 9	1	0.5
パネリスト 10	2.5	2
パネリスト 11	2	1.5
パネリスト 12	2.5	2.5
パネリスト 13	2	1.5
平均	2.3	1.8

- 5 【0184】 また、37℃、1週間保存の前後で上記2で得られた麦芽アルコール飲料のトランス-2-ノネナール濃度を測定した結果、LOX-F4は、保

存前でもトランス-2-ノネナール濃度がLOX+F4に比べて低減し、保存後はLOX+F4の約1/3に抑制できた事が明らかとなった(表5)。

【0185】

[表5]

トランス-2-ノネナール	LOX+F4	LOX-F4
保存前	0.02	0.01
保存後	0.35	0.12

5

(単位：ppb)

【0186】 以上、官能検査の結果と麦芽アルコール飲料中のトランス-2-ノネナール濃度の解析結果から、本発明の麦芽アルコール飲料の製造方法により麦芽アルコール飲料を製造すれば、香味耐久性が改善された麦芽アルコール飲料

10

【0187】 最後に、上記2で得られた麦芽アルコール飲料の濃醇さとキレに関して官能検査と脂質膜センサーにより解析を行った。

【0188】 まず、13人のパネルによる官能検査を行い香味品質を比較した。LOX-F4及びLOX+F4の麦芽アルコール飲料を官能検査に供し、濃醇さとキレの2項目について0~4までの評点(濃醇さが強い、またはキレが良いほど

15

評点が高い)で評価を行った(表6)。

【0189】 濃醇さに関しては、LOX-F4とLOX+F4との間に有意差(5%の危険率)はみられなかった(表6A)。

【0190】 キレに関しては、13人中8人がLOX-F4の方に高い評点をつけた(表6B)。また、LOX-F4はLOX+F4に比べて高い評点(平均値)を示し、その差はt検定により5%の危険率で有意であると判定された。

20

【0191】 以上の結果から、LOX-F4を用いて麦芽アルコール飲料を醸造すると、濃醇さに影響を与えることなく、キレを改善できる事が明らかとなった。

【0192】

[表6A]

濃醇さ	LOX+F4	LOX-F4
パネリスト1	2	1
パネリスト2	3	2
パネリスト3	3	2.5
パネリスト4	3.5	3.5
パネリスト5	3	3
パネリスト6	2	2
パネリスト7	2	2
パネリスト8	3	2
パネリスト9	3	2
パネリスト10	2.5	2.5
パネリスト11	3	2
パネリスト12	2	3
パネリスト13	2	3
平均	2.6	2.3

[表6B]

キレ	LOX+F4	LOX-F4
パネリスト1	1	2
パネリスト2	1	3
パネリスト3	1.5	3
パネリスト4	3	3
パネリスト5	1	1
パネリスト6	2	2
パネリスト7	2	3
パネリスト8	1.5	3
パネリスト9	1	2
パネリスト10	1.5	2
パネリスト11	2	3
パネリスト12	3	2
パネリスト13	3	2
平均	1.8	2.4

5

【0193】 さらに、金田等の方法により (Kaneda, H. et al., J. Biosci. Bioeng.,

92, 221-226, 2001.)、脂質膜センサーを用いて製品の濃醇さとキレを評価した(表7)。

5 【0194】 濃醇さは脂質膜への吸着性により評価されるが、その結果、LOX-F4とLOX+F4の吸着性の間に統計的有意差(危険率5%水準)が認められなかった(表7A)。

【0195】 一方、キレは脂質膜への残存性により評価(キレが劣るほど高い残存性を示す)されるが、LOX-F4はLOX+4に比べ約1/4の残存性を示し、危険率1%水準での有意差が認められた(表7B)。

[表7A]

濃醇さ	吸着性	標準偏差
LOX+F4	189	4
LOX-F4	187	3

10 (単位:Hz。危険率5%水準での有意差認められず)

[表7B]

キレ	吸着性	標準偏差
LOX+F4	12	3
LOX-F4	3	3

(単位:Hz。危険率5%水準での有意差認められず)

15 【0196】 これまで、麦芽LOX-1活性と仕込工程におけるTHOD生成量には相関が見られず(Kobayashi, N. et al., (2000). J. Biosci. Bioeng. 90:69-73.)、麦芽LOX-1の抑制によりどの程度THOD生成が抑制されるのかは不明であった。また、抑制された結果、果たしてキレを改善できるかは従来技術では予想が付かなかった。しかし、本実施例の官能検査結果と脂質膜センサーを利用した製品の濃醇さとキレの解析結果より、本請求遺伝子を利用した麦芽
20 を利用すれば、製品の濃醇さに影響を与える事無く、製品のキレを改善する事が初めて実証された。

【0197】 実施例7 (大麦加工物を使用した麦芽アルコール飲料試験醸造)

【0198】 1. 冷麦汁の製造と分析

5 【0199】 上記実施例3で得られた系統の後代であるLOX-F5およびLOX+F5の大麦加工物を副原料として用い、50Lスケール仕込設備により発
泡酒仕様(麦芽使用率24%、大麦加工物使用率76%)での仕込を行なった。
仕込条件は以下の通りである。

10 【0200】 市販のビール醸造用麦芽1.2kgと、各々の大麦加工物3.8kgを20Lの仕込用水により50℃、30分→65℃、60分→75℃、3分のダイアグラムに従って仕込み(大麦加工物使用比率が高いため、仕込時にはα
アミラーゼ、βグルカナーゼなどの酵素剤を併用した)、ロイター設備により麦汁
ろ過を行ない、最終的に40Lのろ過麦汁を得た。

【0201】 得られたろ過麦汁は、ホップペレット(苦味分析値25.6BU
(EBC))53gを添加して80分間煮沸し、10℃まで冷却し、加水によるエキ
ス調整によりエキス含量7.5~7.6%の冷麦汁とした。

15 【0202】 得られた冷麦汁の分析は、EBC標準法に従い行った。分析値を
表8に示した。表8に記載したように、一般的な分析項目に関してはLOX-F
5とLOX+F5の間で明らかな差は認められなかった。

【0203】

[表 8]

品種	LOX+F5	LOX-F5
比重	1.0303	1.0296
エキス (%)	7.63	7.46
真性非発酵エキス (%)	2.00	2.06
真性最終発酵度 (%)	73.8	72.4
仮性非発酵エキス (%)	0.67	0.71
仮性最終発酵度 (%)	91.2	90.5
pH	5.69	5.71
色度 (° EBC)	5.7	6.5
BU	31.7	30.9
全窒素 (mg/100mL)	45	47
ポリフェノール (mg/L)	159	137
FAN (mg/L)	72	72

【0204】 2. 麦芽アルコール飲料（発泡酒）の製造

【0205】 上記1で得られた冷麦汁を蒸気殺菌した30Lスケールのシリン
 5 ドロコニカル型タンクに移し、初期濃度3000万cells/mLとなるよう
 に酵母を添加し、15℃にて主発酵を行なった。発酵液のエキスが1.3%まで
 切れた段階で同型のタンクに移し替え、貯酒工程を行なった。貯酒工程は最初の
 5日間は13℃にて、その後の2週間は0℃にて行なった。

【0206】 貯酒工程の終わった発酵液はビールろ過設備及び充填設備にて、
 10 麦芽アルコール飲料をろ過し、壺への充填を行なった。

【0207】 3. 麦芽アルコール飲料の分析

【0208】 上記2で得られた麦芽アルコール飲料の分析を以下のように行っ
 た。

【0209】 まず、EBC標準法に従い分析を行ったところ、脂質酸化物分析
 15 値以外の一般分析値に関してはLOX-F5とLOX+F5の間で、明らかな差
 は認められなかった（表9）。

【0210】

[表 9]

品種	LOX+F5	LOX-F5
比重	1.00307	1.00338
原麦汁エキス (%)	7.77	7.60
真性エキス (%)	2.11	2.14
真性発酵度 (%)	73.7	72.7
仮性エキス (%)	0.79	0.87
仮性発酵度 (%)	89.9	88.6
アルコール (vol%)	3.62	3.49
アルコール (w/w%)	2.86	2.75
pH	4.58	4.59
ガス圧 (20℃) kg/cm ²	2.29	2.38
色度 (° EBC)	4.0	4.2
全窒素 (mg/100mL)	28	27
BU	16.8	15.3
ポリフェノール (mg/L)	111	91
FAN (mg/L)	16	16

【0211】 次に以下の方法により上記2で得られた麦芽アルコール飲料の泡持ちについて分析を行った。

- 5 【0212】 泡持ち分析は、NIBEM法を利用した。Haffmans社のFOAM STABILITY TESTERを使用し、泡持ちを分析したところ(表10)、LOX-F5大麦はLOX+F5大麦に比べて、NIBEM値が17ポイント高く、高い泡持ちを有する事が明らかとなった。

- 10 【0213】 また、上記実施例5に記載した方法により、麦芽アルコール飲料中のTHOD濃度を測定した結果、LOX-F5はLOX+F5に比べ半分以下に減少していた。

【0214】 以上の結果から、本発明の麦芽アルコール飲料製造方法により製造される麦芽アルコール飲料は、THODの蓄積を抑制することができ、製品の泡持ちを改善できたことが明らかとなった。

[表 10]

品種	LOX+F5	LOX-F5
NIBEM	279	296
THOD (ピーク面積比)	728	237

※THODの値は、内部標準物質のピーク面積を100とした相対値

5 【0215】 次に、以下のように13人のパネルによる官能検査を行い、上記2で得られた麦芽アルコール飲料の香味耐久性を比較した。官能検査の具体的な方法は、実施例6に記載の方法と同様である。

10 【0216】 その結果、老化臭に関しては、13人中11人がLOX-F5の方に低い評点をつけており、LOX-F5はLOX+F5と比べて、低い評点(平均値)を示した。その差はt検定により5%の有意水準で有意であると判定された(表11A)。

【0217】 また、総合老化度に関しては、13人中12人がLOX-F5の方に低い評点をつけており、LOX-F5はLOX+F5と比べて、低い評点(平均値)を示し、その差はt検定により5%の有意水準で有意と判定された(表11B)。

15 【0218】 以上の官能検査と統計分析により、LOX-F5はLOX+F5と比べて、老化臭が低減され、低い総合老化度を有することが明らかとなった。

【0219】

[表 1 1 A]

老化臭	LOX+F5	LOX-F5
パネリスト 1	2	1.5
パネリスト 2	3	2
パネリスト 3	3	2
パネリスト 4	2	1.5
パネリスト 5	3	2
パネリスト 6	2	1
パネリスト 7	2.5	3
パネリスト 8	2	1
パネリスト 9	2.5	2
パネリスト 10	2	1
パネリスト 11	3	2
パネリスト 12	2.5	1.5
パネリスト 13	2	3
平均	2.4	1.8

[表 1 1 B]

総合老化度	LOX+F5	LOX-F5
パネリスト 1	2	1.5
パネリスト 2	3	1
パネリスト 3	3.5	1.5
パネリスト 4	2	1.5
パネリスト 5	3	2
パネリスト 6	2	1
パネリスト 7	2.5	3
パネリスト 8	2	1
パネリスト 9	3	2
パネリスト 10	2	1
パネリスト 11	3	2
パネリスト 12	2.5	1.5
パネリスト 13	3	1.5
平均	2.6	1.6

- 5 【0220】 また、37℃、1週間保存の前後で上記2で得られた麦芽アルコール飲料のトランス-2-ノネナール濃度を測定した結果、LOX-F5は、保

存前のトランス-2-ノネナール濃度はLOX+F5と同等であったが、保存後はLOX+F5の約1/2程度に抑制できた事が明らかとなった(表12)。

【0221】

[表12]

トランス-2-ノネナール	LOX+F5	LOX-F5
保存前	0.06	0.06
保存後	0.16	0.09

5

(単位: ppb)

【0222】 実施例8 (麦芽アルコール飲料試験醸造)

【0223】 1. 冷麦汁の製造と分析

10 【0224】 上記実施例4と同様の方法で得られたLOX-F4大麦およびLOX+F4大麦の2点から作製した麦芽を用い、50Lスケール仕込設備により麦芽を原料として用いたビール仕様(麦芽使用率71%)での仕込を行なった。仕込条件は以下の通りである。

15 【0225】 上記の試験麦芽5.0kgと、合計2.0kgの副原料(コーンスターチ、コーングリッツ、碎米)を23Lの仕込用水により50℃、20分→65℃、40分→75℃、3分のダイアグラムに従って仕込み、ロイター設備により麦汁ろ過を行ない、最終的に40Lのろ過麦汁を得た。

【0226】 得られたろ過麦汁は、ホップペレット(苦味分析値44.9BU(EBC))40gを添加して90分間煮沸し、10℃まで冷却し、加水によるエキス調整によりエキス含量10.8~11.1%の冷麦汁とした。

20 【0227】 得られた冷麦汁の分析は、EBC標準法に従い行った。分析値を表13に示した。表13に記載したように、一般的な分析項目に関してはLOX-F4とLOX+F4の間で明らかな差は認められなかった。

【0228】

[表 1 3]

品種	LOX+F 4	LOX-F 4
比重	1.0444	1.0433
エキス (%)	11.05	10.79
真性非発酵エキス (%)	3.05	3.05
真性最終発酵度 (%)	72.4	71.7
仮性非発酵エキス (%)	1.25	1.31
仮性最終発酵度 (%)	88.7	87.9
pH	5.71	5.68
色度 (° EBC)	6.3	6.5
BU	38.0	38.2
全窒素 (mg/100mL)	77	78
ポリフェノール (mg/L)	150	147
FAN (mg/L)	153	148

【0229】 2. 麦芽アルコール飲料（ビール）の製造

【0230】 上記1で得られた冷麦汁を蒸気殺菌した30Lスケールのシリン
 5 ドロコニカル型タンクに移し、初期濃度1500万cells/mLとなるよう
 に酵母を添加し、10.5℃にて主発酵を行なった。発酵液のエキスが2.5%
 まで切れた段階で同型のタンクに移し替え、貯酒工程を行なった。貯酒工程は最
 初の8日間は8℃にて、その後の2週間は0℃にて行なった。

【0231】 貯酒工程の終わった発酵液はビールろ過設備及び充填設備にて、
 10 麦芽アルコール飲料をろ過し、壺への充填を行なった。

【0232】 3. 麦芽アルコール飲料の分析

【0233】 以下の方法により上記2で得られた麦芽アルコール飲料の泡持ち
 について分析を行った。泡持ち分析は、NIBEM法を利用した。Haffmans 社
 のFOAM STABILITY TESTERを使用し、泡持ちを分析したところ（表14）、
 15 LOX-F 4大麦はLOX+F 4大麦に比べて、NIBEM値が30ポイント高
 く、高い泡持ちを有する事が明らかとなった。

【0234】 また、上記実施例5に記載した方法により、麦芽アルコール飲料

中のTHOD濃度を測定した結果、LOX-F 4はLOX+F 4に比べ半分以下に減少していた。

【0235】 以上の結果から、本発明の麦芽アルコール飲料製造方法により製造される麦芽アルコール飲料は、THODの蓄積を抑制することができ、製品の泡持ちを改善できたことが明らかとなった。

【0236】

[表14]

品種	LOX+F 4	LOX-F 4
NIBEM	273	303
THOD (ピーク面積比)	499	221

※THODの値は、内部標準物質のピーク面積を100とした相対値

【0237】 次に、以下のように13人のパネルによる官能検査を行い、上記2で得られた麦芽アルコール飲料の香味耐久性を比較した。官能検査の具体的な方法は、実施例6に記載の方法と同様である。

【0238】 その結果、老化臭に関しては、13人中11人がLOX-F 4の方に低い評点をつけており、LOX-F 4はLOX+F 4と比べて、低い評点(平均値)を示した。その差はt検定により5%の有意水準で有意であると判定された(表15A)。

【0239】 また、総合老化度に関しては、13人中12人がLOX-F 4の方に低い評点をつけており、LOX-F 4はLOX+F 4と比べて、低い評点(平均値)を示し、その差はt検定により5%の有意水準で有意と判定された(表15B)。

【0240】 以上の官能検査と統計分析により、LOX-F 5はLOX+F 5と比べて、老化臭が低減され、低い総合老化度を有することが明らかとなった。

【0241】

[表 1 5 A]

老化臭	LOX+F4	LOX-F4
パネリスト 1	2.5	2
パネリスト 2	3	3.5
パネリスト 3	3.5	2
パネリスト 4	2.5	2
パネリスト 5	1.5	1
パネリスト 6	3	1
パネリスト 7	2.5	3
パネリスト 8	3	2
パネリスト 9	2	1.5
パネリスト 1 0	2	1
パネリスト 1 1	3	1.5
パネリスト 1 2	1.5	1
パネリスト 1 3	2	1
平均	2.5	1.7

[表 1 5 B]

総合老化度	LOX+F4	LOX-F4
パネリスト 1	3	2
パネリスト 2	3	3.5
パネリスト 3	3	1.5
パネリスト 4	2.5	2
パネリスト 5	1.5	1
パネリスト 6	3	1
パネリスト 7	3	2.5
パネリスト 8	3	2
パネリスト 9	2	1
パネリスト 1 0	2	1
パネリスト 1 1	3	1
パネリスト 1 2	1.5	1
パネリスト 1 3	2	1
平均	2.5	1.6

- 5 【0 2 4 2】 以上、官能検査の結果と麦芽アルコール飲料中のトランス-2-ノネナール濃度の解析結果から、本発明の麦芽アルコール飲料の製造方法により

麦芽アルコール飲料を製造すれば、香味耐久性が改善された麦芽アルコール飲料が得られることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

- 5 【0243】 遺伝子操作することなく、香味耐久性や泡持ちを改善された麦芽アルコール飲料を製造するために有用な、LOX-1変異遺伝子と、LOX-1欠失大麦の選抜方法と、選抜によって得られた大麦に由来する麦芽アルコール飲料用原料と、前記麦芽アルコール飲料用原料を用いた麦芽アルコール飲料の製造方法と、を提供することが可能となる。

請求の範囲

1. 大麦リポキシゲナーゼー1遺伝子第5イントロンのスプライシング供与部位(5'-GT-3')のグアニンが他の塩基に変異していることを特徴とする大麦リポキシゲナーゼー1変異遺伝子。

5 2. 前記他の塩基がアデニンであることを特徴とする請求項1に記載の大麦リポキシゲナーゼー1変異遺伝子。

3. 大麦リポキシゲナーゼー1遺伝子第5イントロンのスプライシング供与部位のグアニンが他の塩基に変異しているか否かにより大麦リポキシゲナーゼー1欠失大麦を判別することを特徴とする大麦リポキシゲナーゼー1欠失大麦の選抜方法。

10

4. 前記他の塩基がアデニンであることを特徴とする請求項3に記載の大麦リポキシゲナーゼー1欠失大麦の選抜方法。

5. 被検対象である大麦からゲノムDNAを抽出するゲノムDNA抽出工程と、

15 抽出したゲノムDNAから大麦リポキシゲナーゼー1遺伝子第5イントロンのスプライシング供与部位を含むDNA断片を増幅するDNA断片増幅工程と、

前記DNA断片増幅工程で増幅された大麦リポキシゲナーゼー1遺伝子第5イントロンのスプライシング供与部位を含むDNA断片を制限酵素で切断して所定の塩基数のDNA断片を検出し、スプライシング供与部位のグアニンが他の塩基

20

に変異しているか否かにより大麦リポキシゲナーゼー1欠失大麦を判別するDNA断片検出工程と、
を含むことを特徴とする請求項3または4に記載の大麦リポキシゲナーゼー1欠失大麦の選抜方法。

6. 前記DNA断片検出工程において使用する制限酵素が塩基配列5'-GTAC-3'を認識するAfaIおよび/またはRsaIであることを特徴とする請求項5に記載の大麦リポキシゲナーゼー1欠失大麦の選抜方法。

25

7. 請求項1または2に記載の大麦リポキシゲナーゼ-1変異遺伝子を持つ大麦に由来する種子、麦芽、モルトエキス、大麦分解物または大麦加工物であることを特徴とする麦芽アルコール飲料用原料。

5 8. 請求項3～6のうちのいずれか1項に記載の選抜方法により選抜された大麦に由来する種子、麦芽、モルトエキス、大麦分解物または大麦加工物であることを特徴とする麦芽アルコール飲料用原料。

9. 請求項7または8に記載の麦芽アルコール飲料用原料を用いることを特徴とする麦芽アルコール飲料の製造方法。

10 10. 配列番号10の1～1554番目の塩基で表される塩基配列からなる核酸。

11. 配列番号11で表される塩基配列からなる核酸。

12. 配列番号11で表される塩基配列からなる核酸において、3178番目の塩基を含む10～60の連続した塩基配列からなる核酸。

15 13. 大麦サンプルからゲノムDNAを単離する工程と、配列番号11で表される塩基配列の3178番目の塩基を検出し、その塩基の存在を当該大麦のLOX-1活性の存在の指標とする工程と、を含む、大麦におけるLOX-1活性の存在を検出する方法。

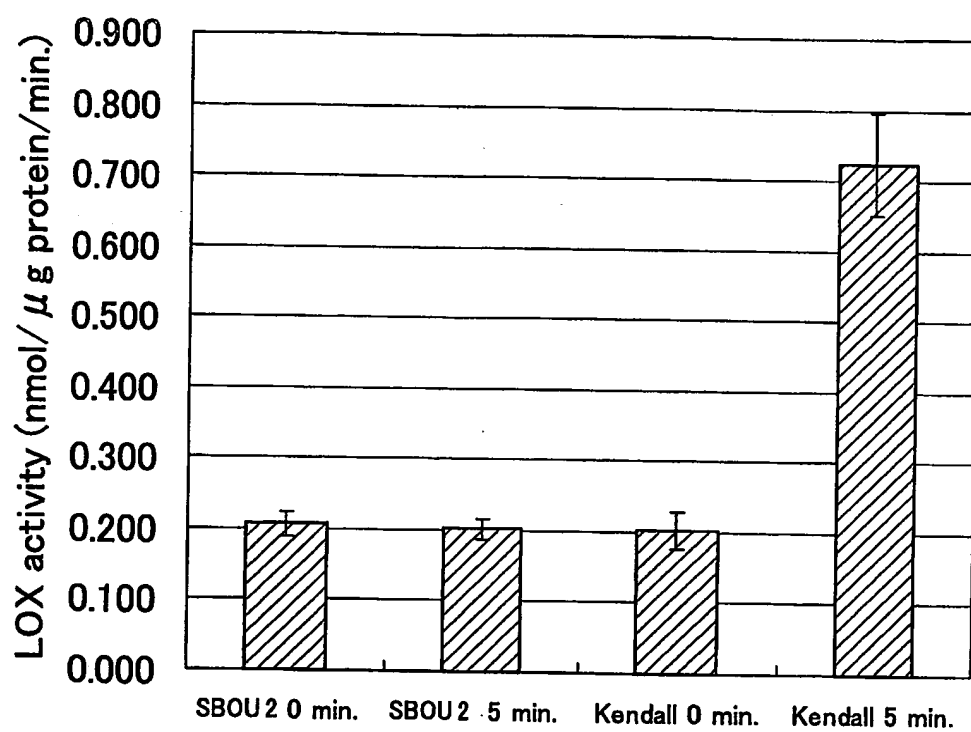
 1

図2

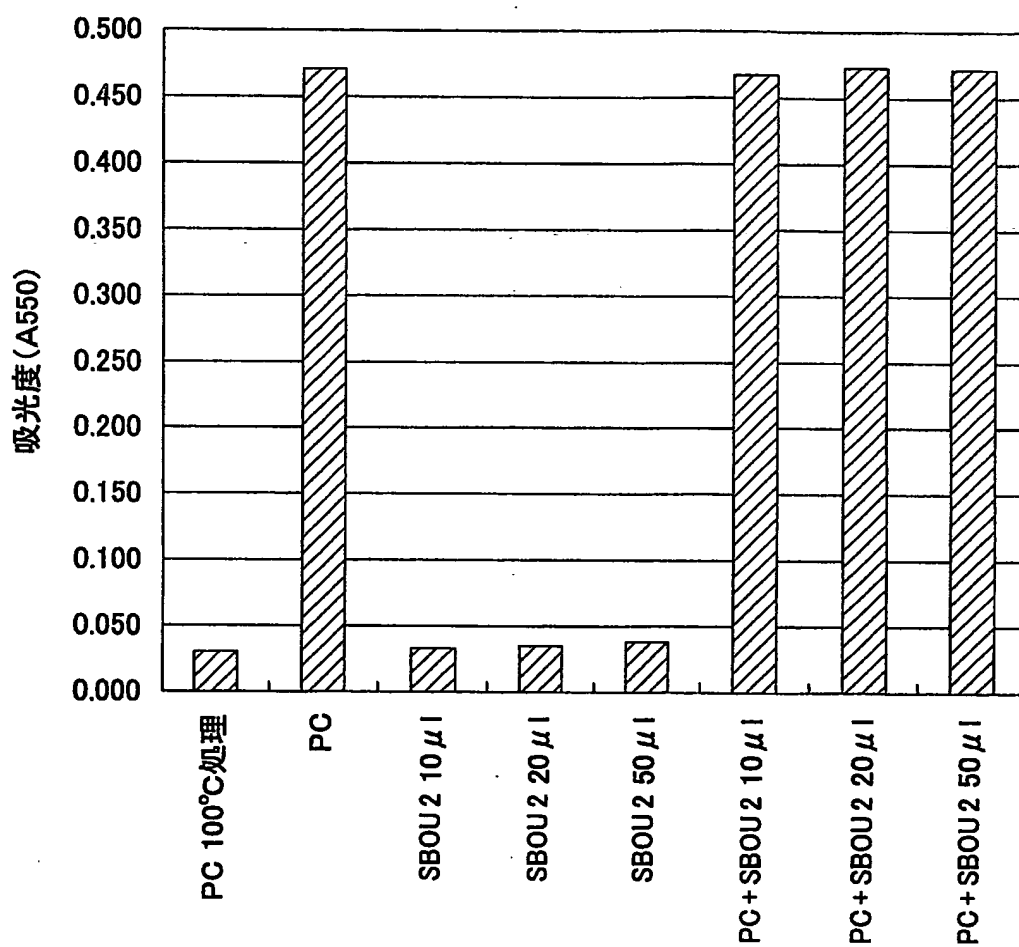


図3

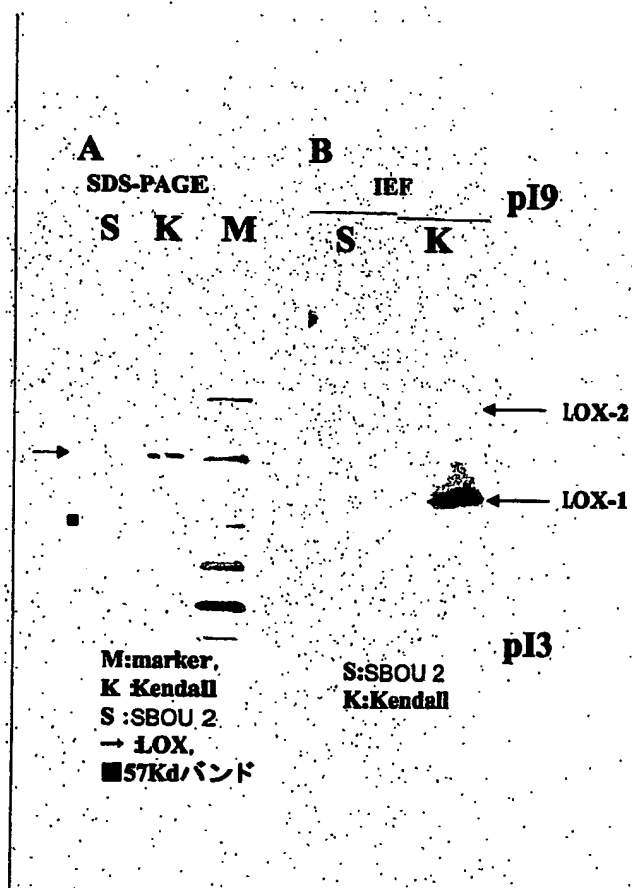


図4

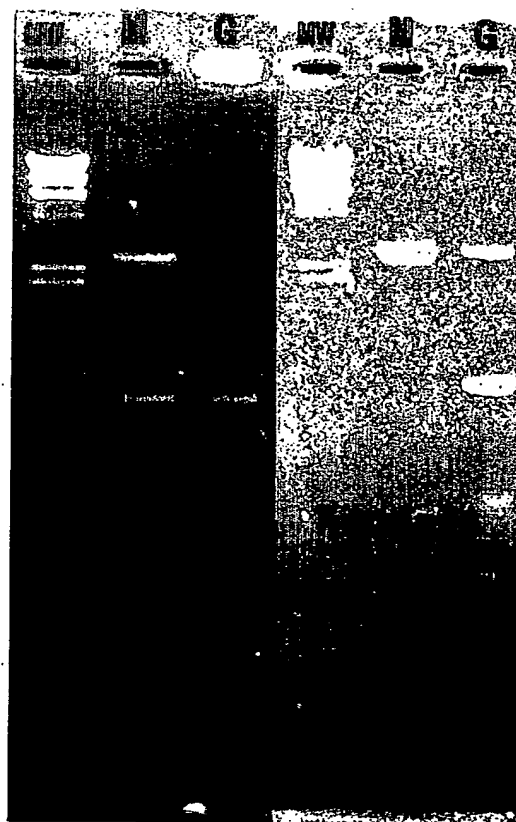
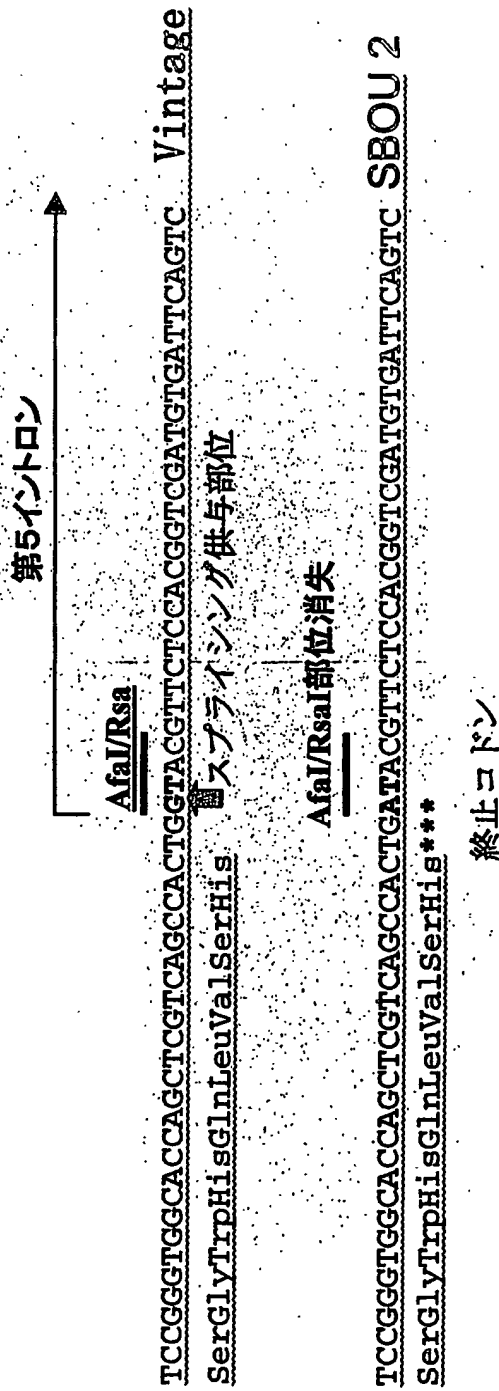
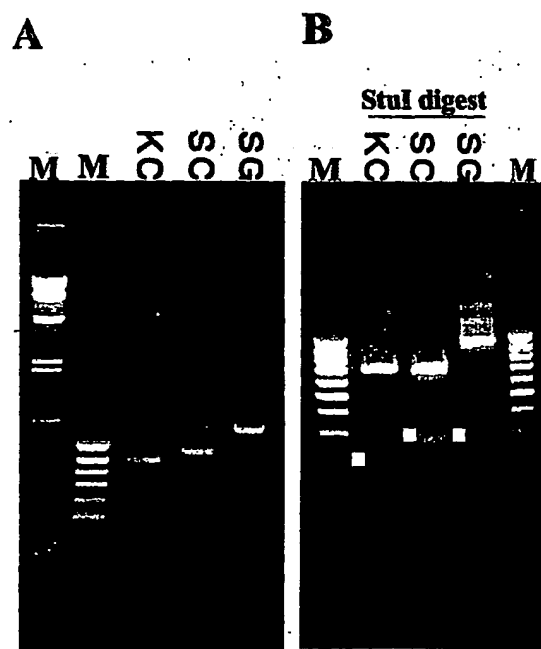


図5



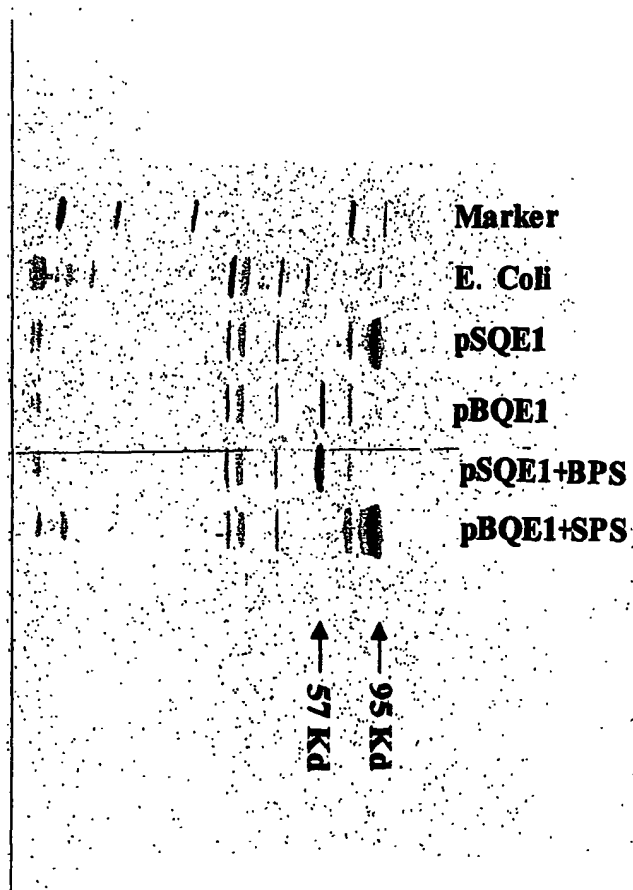
LOX-1遺伝子第5イントロンスプライシング供与部位領域の塩基配列

図6

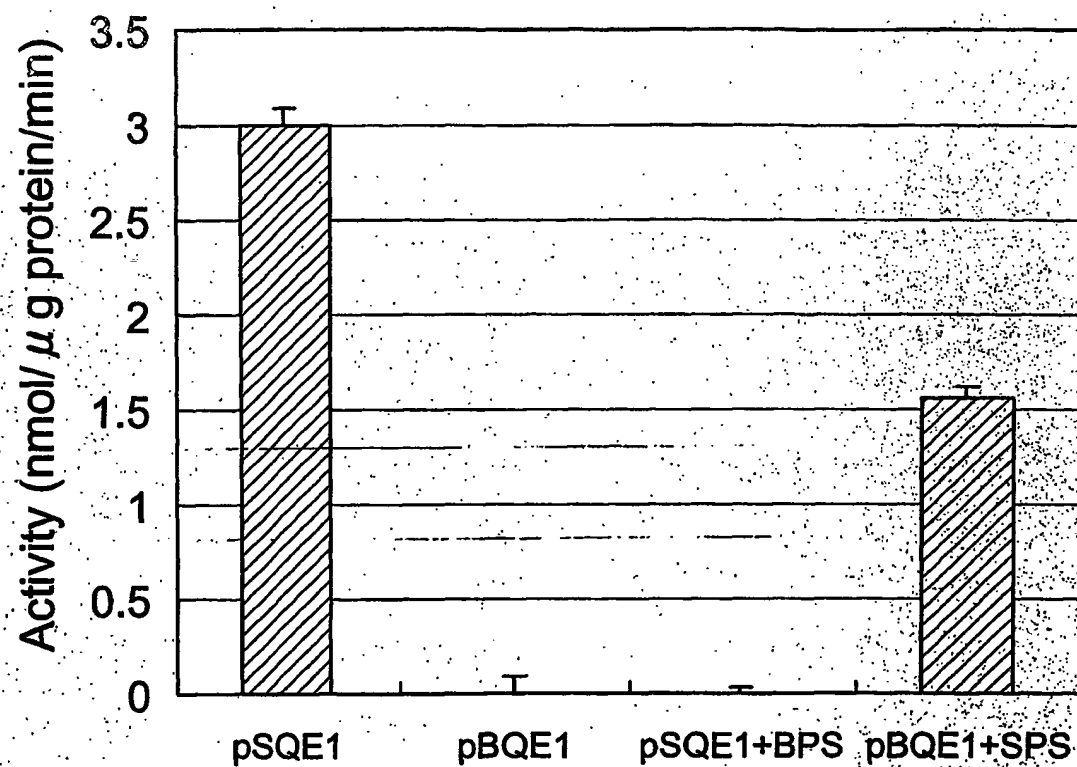


M: Marker,
 KC: Kendall cDNA template
 SC: SBOU 2 cDNA template
 SG: SBOU 2 genomicDNA template

図7



8



9



M:Marker

F2:Kendall x SBOU 2 F2 DNA AfaI法分析

図10

F2個体No.	LOX活性	Afel法 OAPS	JBO970 サザン	F2個体No.	LOX活性	Afel法 OAPS	JBO970 サザン
1	+	KB	KB	73	+	KB	KB
2	+	KK	KK	74	+	KB	KB
3	+	KB	KB	75	+	KK	KK
4	-	BB	KB	76	+	KB	KB
5	-	BB	BB	77	+	KK	KK
6	-	BB	BB	78	-	BB	BB
7	+	KK	KK	79	+	KB	KB
8	+	KB	KB	80	-	BB	BB
9	+	KB	KB	81	-	BB	BB
10	-	BB	BB	82	+	KB	KB
11	-	BB	KB	83	+	KK	KK
12	+	KB	KB	84	+	KK	KK
13	-	BB	BB	85	-	BB	BB
14	+	KK	KK	86	-	BB	BB
15	+	KB	KB	87	-	BB	BB
16	+	KB	KB	88	+	KB	KB
17	+	KK	KK	89	-	BB	BB
18	+	KB	KB	90	-	BB	BB
19	+	KK	KK	91	+	KK	KK
20	+	KK	KK	92	+	KB	KB
21	-	BB	KB	93	+	KB	KB
22	+	KK	KK	94	+	KK	KK
23	+	KB	KB	95	+	KB	KB
24	+	KK	KK	96	+	KB	KB
25	+	KB	KB	97	+	KK	KK
26	+	KB	KB	98	+	KB	KB
27	+	KK	KK	99	+	KB	KB
28	+	KK	KK	100	+	KB	KB
29	+	KK	KK	101	-	BB	BB
30	+	KB	KB	102	+	KB	KB
31	+	KB	KB	103	+	KB	KB
32	-	BB	KB	104	+	KB	KB
33	+	KB	KB	105	+	KB	KB
34	+	KB	KB	106	+	KK	KK
35	+	KK	KB	107	+	KK	KK
36	+	KB	KB	108	+	KK	KK
37	+	KB	KB	109	+	KB	KB
38	+	KK	KK	110	-	BB	BB
39	+	KB	-	111	-	BB	BB
40	+	KB	-	112	+	KB	KB
41	-	BB	BB	113	+	KB	KB
42	+	KB	KB	114	+	KB	KB
43	+	KK	KK	115	-	BB	BB
44	+	KB	KB	116	+	KB	KB
45	-	BB	BB	117	-	BB	BB
46	+	KK	KK	118	+	KK	KK
47	-	BB	BB	119	+	KB	KB
48	+	KK	KB	120	+	KK	KK
49	+	KB	KB	121	+	KB	KB
50	-	BB	BB	122	+	KB	KB
51	+	KB	KB	123	+	KK	KK
52	+	KB	KB	124	+	KB	KB
53	+	KK	KK	125	-	BB	BB
54	-	BB	BB	126	+	KK	KK
55	+	KK	KK	127	+	KB	KB
56	-	BB	BB	128	+	KB	BB
57	+	KB	KB	129	+	KB	KB
58	+	KB	KB	130	+	KB	KB
59	-	BB	BB	131	+	KK	KB
60	-	BB	BB	132	+	KK	KK
61	+	KK	KK	133	-	BB	BB
62	+	KK	KK	134	-	BB	BB
63	+	KK	KK	135	+	KK	KK
64	+	KB	KB	136	+	KB	KB
65	+	KB	KB	137	+	KB	KK
66	+	KK	KK	138	+	KB	KB
67	+	KB	KB	139	-	BB	BB
68	+	KK	KK	140	+	KK	KK
69	+	KB	KB	141	+	KB	KB
70	-	BB	BB	142	+	KB	BB
71	+	KB	KB	143	+	KK	KK
72	-	BB	BB	144	+	KB	KB

図 11

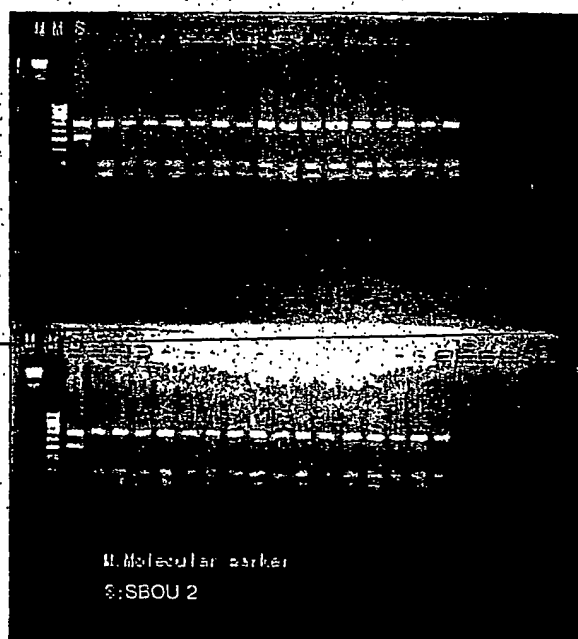


図12

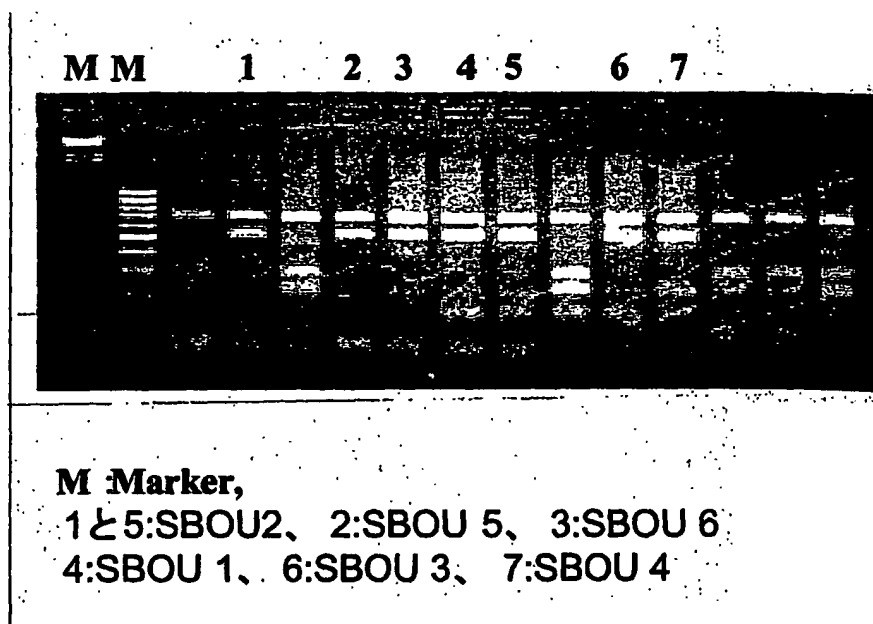
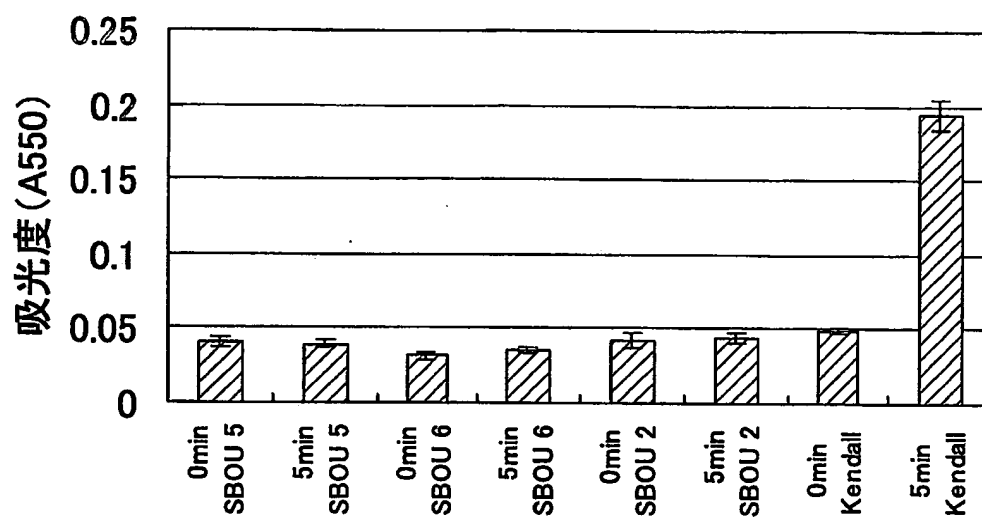


図 13

A



B

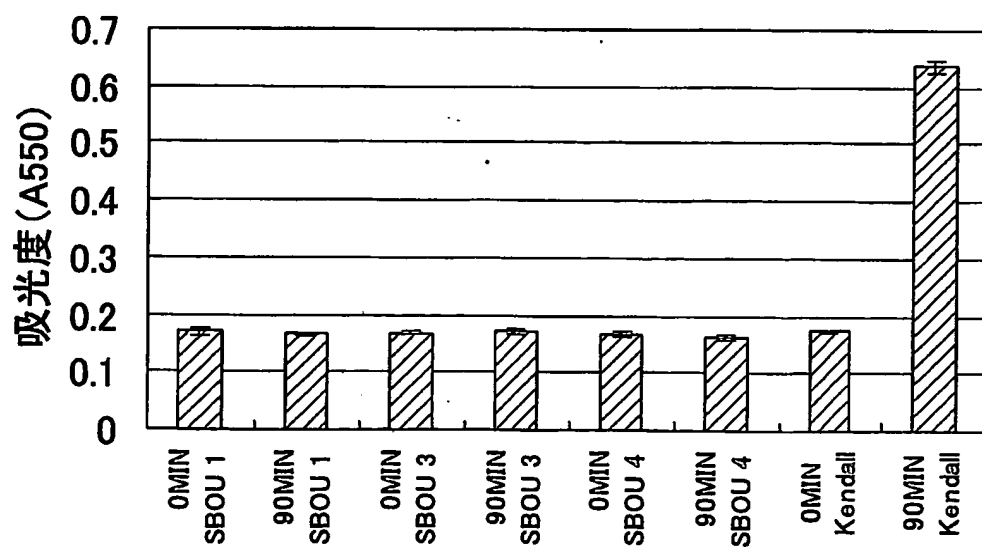
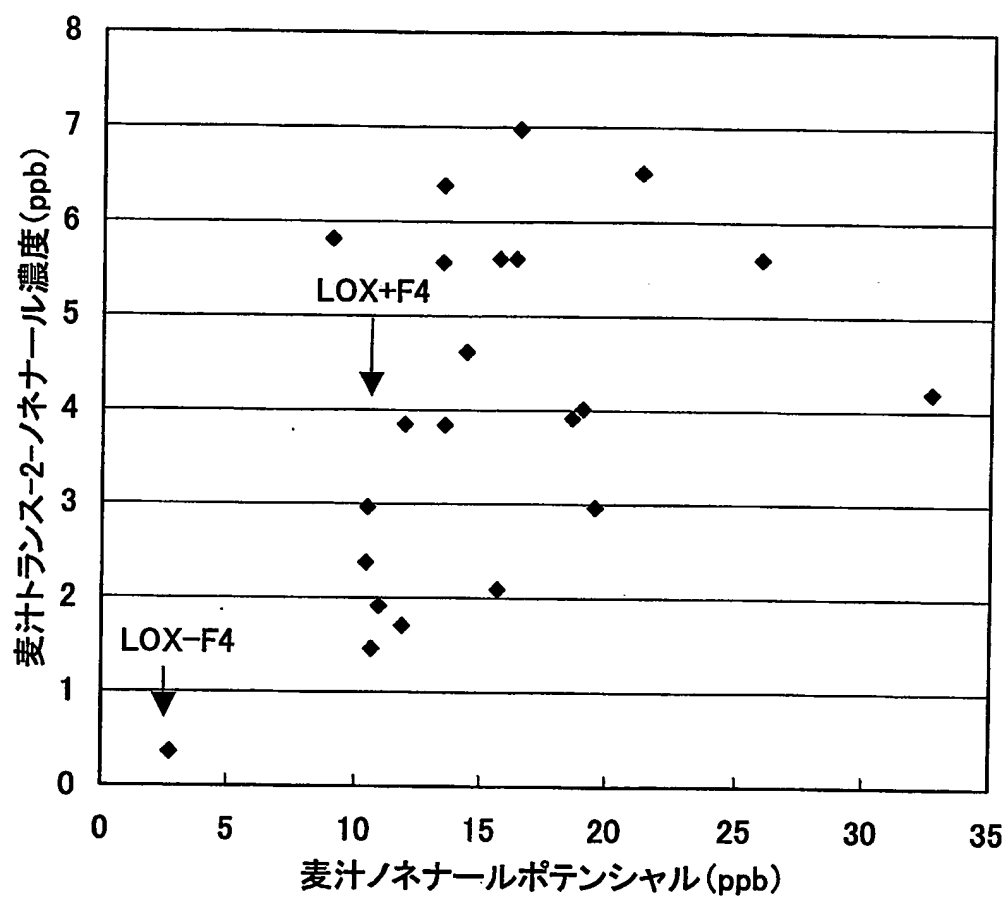


図14

品種	Lox+F4	Lox- F4
大麦水分 (%)	10.9	11.0
大麦重量 (g)	3000	3000
浸麦度 (%)	44.8	44.5
浸麦時間 (h)	82	82
麦芽収量 (g)	2571.6	2572.2
麦芽収率 (%ad)	85.7	85.7
麦芽収率 (%db)	90.3	90.7
水分 (%)	6.1	5.8
糖化時間 (分)	9~15	9~15
ろ過速度 (分)	8	17
透明度	2	2
色度 (EBC)	2.1	2.2
煮沸色度 (EBC)	3.2	3.3
風乾エキス (%)	67.0	69.3
無水エキス (%)	71.4	73.5
TN(%)	2.490	2.291
SN(%)	0.648	0.645
粗蛋白質 (%)	15.6	14.3
KZ	26.0	28.1
EVG(%)	78.8	79.0
DP(° WK)	348	377
DP(WK/TN)	140	165
粘度 (mPa·s)	1.87	1.89
β -グルカン (mg/l)	427	392
pH	5.97	6.00
エキス収量 (%)	64.5	66.7

図15



SEQUENCE LISTING

<110> SAPPORO BREWERIES LTD.

<120> Barley Lipoxygenase-1 Gene, Selection Method for Barley, Materials for Malt alcoholic beverages and Method for Production of Malt alcoholic beverages

<130> FP04-0052

<150> JP 2003-083924

<151> 2003-03-25

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 240

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 1

ctcgccaagg cctacgtcgc cgtcaatgac tccgggtggc accagctcgt cagccactgg 60

tacgttctcc acggtcgatg tgattcagtc agtcgatgca caacaactga tcgaaatag 120

attgattgaa acgcgcaggc tgaacactca cgcggtgatg gagccgttcg tgatctcgac 180

gaaccggcac cttagcgtga cgcacccggt gcacaagctg ctgagcccgc actaccgcga 240

<210> 2

<211> 240

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 2

ctcgccaagg cctacgtcgc cgtcaatgac tccgggtggc accagctcgt cagccactga 60

tacgttctcc acggtcgatg tgattcagtc agtcgatgca caacaactga tcgaaatag 120

attgattgaa acgcgcaggc tgaacactca cgcggtgatg gagccgttcg tgatctcgac 180

gaaccggcac cttagcgtga cgcacccggt gcacaagctg ctgagcccgc actaccgcga 240

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 3

ggagaggagg ccaagaacaa gatg

24

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 4
ggtgcccgat ggcttagat

19

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 5
cacgtgccg tccgatccat c

21

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 6
ccatcacgca gggcatcctg

20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 7
gcgttgatga gcgtctgccg

20

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer for LOX-1 with BamHI site

<400> 8
 ggatccatgc tgctgggagg gctg 24

<210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer for LOX-1 with HindIII site

<400> 9
 aagcttttag atggagatgc tgttg 25

<210> 10
 <211> 2668
 <212> DNA
 <213> Hordeum vulgare

<400> 10
 atgctgctgg gagggtgat cgacaccctc acgggggcga acaagagcgc ccggctcaag 60
 ggcacggtgg tgctcatgcg caagaacgtg ctggacctca acgacttcgg cgccaccatc 120
 atcgacggca tcggcgagtt cctcggcaag ggcgtcacct gccagcttat cagctccacc 180
 gccgtcgacc aagacaacgg cggtcgcggg aaggtgggcg cggaggcgga gctggagcag 240
 tgggtgacga gcctgccgtc gctgacgacg ggggagtcca agttcggcct caccttcgac 300
 tgggaggtgg agaagctcgg ggtgccgggc gccatcgteg tcaacaacta ccacagctcc 360
 gagttcctgc ttaaaacat caccctccac gacgtccccg gccgcagcgg caacctcacc 420
 ttctgcgcca actcatggat ctaccccgcc gccaaactacc gatacagccg cgtcttcttc 480
 gccaacgaca cgtacctgcc gagccagatg ccggcggcgc tgaagccgta ccgcgacgac 540
 gagctccgga acctgcgtgg cgacgaccag caggggccgt accaggagca cgaccgcatc 600
 taccgctacg acgtctacaa cgacctcggc gagggccgcc ccctcctcgg cggcaactcc 660
 gaccaccctt acccgcgccg cggccgcacg gagcgcaagc ccaacgccag cgacccgagc 720
 ctggagagcc ggctgtcgct gctggagcag atctacgtgc cgcgggacga gaagttcggc 780
 cacctcaaga cgtccgactt cctgggctac tccatcaagg ccatcacgca gggcatcctg 840
 ccggccgtgc gcacctacgt ggacaccacc ccggcgaggt tcgactcctt ccaggacatc 900
 atcaacctct atgagggcgg catcaagctg cccaaggtgg ccgccctgga ggagctccgt 960
 aagcagttcc cgctccagct catcaaggac ctctccccg tcggcggcga ctccctgctt 1020
 aagctccccg tgccccacat catccaggag aacaagcagg cgtggaggac cgacgaggag 1080

ttcgcacggg aggtgctcgc cggcgtcaac ccggtcatga tcacgcgtct cacggagttc	1140
ccgccaaaaa gtagtctgga ccctagcaag tttggtgacc acaccagcac catcacggcg	1200
gagcacatag agaagaacct cgagggcctc acggtgcagc aggcgctgga aagcaacagg	1260
ctgtacatcc ttgatcacca tgaccggttc atgccgttcc tgatcgacgt caacaacctg	1320
cccggcaact tcattctacgc cacgaggacc ctcttcttcc tgcgcggcga cggcaggctc	1380
acgccgctcg ccattcgagct gagcgagccc atcatccagg gcggccttac cacggccaag	1440
agcaaggttt acacgccggt gccagcggc tccgtgaag gctgggtgtg ggagctcgcc	1500
aaggcctacg tcgccgtcaa tgactccggg tggcaccagc tcgtcagcca ctgatacgtt	1560
ctccacggtc gatgtgattc agtcagtcca tgcacaacaa ctgatcgaaa tatgattgat	1620
tgaaacgcgc aggtgaaca ctacgcggt gatggagccg ttcgtgatct cgacgaaccg	1680
gcaccttagc gtgacgcacc cgggtgcacaa gctgctgagc ccgcactacc gcgacaccat	1740
gaccatcaac gcgctggcgc ggcagacgct catcaacgcc gcggcatct tcgagatgac	1800
ggtgttcccg ggcaagtctg cgttggggat gtcggccgtg gtgtacaagg actggaagtt	1860
caccgagcag ggactgccgg acgatctcat caagaggggc atggcgggtg aggaccgtc	1920
gagcccgtac aagggtcggt tgctggtgtc ggactaccgg tacgcggcgg acgggctggc	1980
gatctggcac gccattgagc agtacgtgag cgagtacctg gccatctact acccgaacga	2040
cggcgtgctg cagggcgata cggaggtgca ggcgtggtgg aaggagacgc gcgaggtcgg	2100
gcacggcgac ctcaaggacg ccccatggtg gcccaagatg caaagtgtgc cggagctggc	2160
caaggcgtgc accaccatca tctggatcgg gtcggcgctg catgcggcag tcaacttcgg	2220
gcagtacccc tacgcggggt tcctcccgaa ccggccgacg gtgagccggc gccgcatgcc	2280
ggagcccggc acggaggagt acgcggagct ggagcgcgac ccggagcggg ccttcatcca	2340
caccatcacg agccagatcc agaccatcat cggcgtgtcg ctgctggagg tgctgtcgaa	2400
gcactcctcc gacgagctgt acctcgggca gcgggacacg ccggagtgga cctcggaccc	2460
aaaggccctg gaggtgttca agcggttcag cgaccggctg gtggagatcg agagcaaggt	2520
ggtgggcatg aaccatgacc cggagctcaa gaaccgcaac ggcccggcta agtttcccta	2580
catgctgtc taccceaaca cctccgacca caagggcgcc gtcgccgggc ttaccgcaa	2640
gggcatcccc aacagcatct ccatctaa	2668

<211> 4393
 <212> DNA
 <213> Hordeum vulgare

<400> 11

```

cacgtcgccg tccgatccat ctctccaaag ccgagcgcca caccaccggg accggaccgc      60
gaccggccta taaattgccc ggaccgagct gcaagcagct cctcacacac actcacgcaa      120
cacacatcca tcttactga aaagtgaana acagtgtgct ggtgccattg gttggagcag      180
tgaaagcgag gagaggagc caagaacaag atgtgtctgg gagggctgat cgacaccctc      240
acggggggga acaagagcgc ccggctcaag ggcacgggtg tgctcatgcg caagaacgtg      300
ctggacctca acgacttcgg cgccaccatc atcgacggca tcggcgagtt cctcggcaag      360
ggcgtcacct gccagcttat cagctccacc gccgtcgacc aaggtaatca ctaccctcct      420
ccggccttct cctctgttta caagatatag tatttcttct gtgtgggccc gcgcccatgg      480
atggatggat gtgtctggat cggctaaaga agataggata gctagccctg gccggtcgtc      540
tttacctgag catgggcata tgccatcgaa aaaagagaca acagcatgca tgcatggtgc      600
gcgcaccaga ccacgcagag caccggatgc tcgagacaaa gcaacacaac aagcaaggac      660
gacacgtcaa aagcaacaca acaagcaagg acggcacgtc aaaagcaaca caaacctaaa      720
ctaaagcaca aagacgtaag agcaagcaca caatcagcag gctataaaca gttgtcatca      780
aaaacaacgc tggaagagag agagaaggaa ggaagtagta gccatgaaaa attaaatcac      840
cgggcgttgc tctttgccc acaattaatc aagcagggtg cgtggcatgt atagttcttg      900
taagtaaact aagcatgtga tatgagaagg tacgtgggtg tgacagacaac ggcggtcgcg      960
ggaaggtggg cgcggaggcg gagctggagc agtgggtgac gagcctgccg tcgtgacga      1020
cgggggagtc caagttcggc ctacacctcg actgggaggt ggagaagctc ggggtgccgg      1080
gcgccatcgt cgtcaacaac taccacagct ccgagttcct gcttaaaacc atcacctcc      1140
acgacgtccc cggccgcagc ggcaacctca ccttcgtcgc caactcatgg atctacccc      1200
ccgccaacta ccgatacagc cgcgtcttct tcgccaacga cgtgcgtgga ttttctctta      1260
ctttctctc ctttcatttt caccgccttc gtcattcatg gtcgatcatt aagtcttgcc      1320
aggacaatag atgatgagct aggagtgggt accacttagc agtacgtaca ttattttatc      1380
cgtgttggtg gaaaaggata tggtttggtg cagatcgaca caagattgaa tgaaagttgc      1440
accgtggcac cgtggcagcg tggtaggtga aaataactgt tgcacggatc caccacatg      1500
attgttttca tgaataaact ttttaaggat gtgtctagcc acatctagat gcatgtcaca      1560

```

taattattgc ataccaaaac gattaaatta agcataaaaa gaaaaggaaa aaaataactca	1620
catatctcga cgtaagatca atgatatagt atttagatat gcaatattta tcttacatct	1680
aaacctttct tcattcctaa atataagaca tttgtaagat ttcactatgg acaacatacg	1740
aaacaaaatc agtggatctc tctatgcatt cattatgtag tctataataa aatctttaaa	1800
agatcgtata ttttgcaacg gagggagtaa aacataactt tttaatagta atgttgcacg	1860
gctccacact cgcagacgta cctgccgagc cagatgccgg cggcgctgaa gccgtaccgc	1920
gacgacgagc tccggaacct gcgtggcgac gaccagcagg gcccgtagca ggagcacgac	1980
cgcactctacc gctacgacgt ctacaacgac ctccggcgagg gccgccccat cctcggcggc	2040
aactccgacc acccttaccg gcgcgcggcg cgacaggagc gcaagcccaa cgccagcgac	2100
ccgagcctgg agagccggct gtgcgtgctg gagcagatct acgtgccgag ggacgagaag	2160
ttcggccacc tcaagacgtc cgacttcctg ggctactcca tcaaggccat cacgcagggc	2220
atcctgccgg ccgtgcgcac ctacgtggac accacccccg gcgagttcga ctcttccag	2280
gacatcatca acctctatga gggcgccatc aagctgccca aggtggccgc cctggaggag	2340
ctccgtaagc agttcccgct ccagctcatc aaggacctcc tcccgtcgg cggcgactcc	2400
ctgcttaagc tcccgtgcc ccacatcatc caggagaaca agcaggcgtg gaggaccgac	2460
gaggagtctg cacgggaggt gctcgccggc gtcaaccggc tcatgatcac gcgtctcacg	2520
gtgagtcagc gattatttgt tcatttgttg tgtatggtgt ccatggtgag aaagtgcaga	2580
tcttgatttg cgttgggtcg catgcacgca tgctgcatgc atgcaggagt tcccgc aaa	2640
aagtagtctg gaccctagca agtttggtga ccacaccagc accatcacgg cggagcacat	2700
agagaagaac ctgcagggcc tcacggtgca gcaggttaatt ggtccaagcc atcgacatca	2760
actatgattt acctaggagt aattggtagc tgtagataat ttggcttcgt tgcaattaat	2820
ttgatgctgg ccgatcaagt gatcgtattg ggtttgaaat ttgcaggcgc tggaaagcaa	2880
caggctgtac atccttgatc accatgaccg gttcatgccg ttcctgatcg acgtcaacaa	2940
cctgcccggc aacttcatct acgccacgag gaccctcttc ttcctgcgcg gcgacggcag	3000
gctcacgccg ctgcgcatcg agctgagcga gccatcatc caggcgccgc ttaccacggc	3060
caagagcaag gtttacacgc cgggtcccag cggctccgtc gaaggctggg tgtgggagct	3120
cgccaaggcc tacgtcgccg tcaatgactc cgggtggcac cagctcgtca gccactgata	3180
cgttctccac ggctgatgtg attcagtcag tcgatgcaca acaactgatc gaaatatgat	3240
tgattgaaac gcgcaggctg aacactcacg cgggtgatgga gccgttcgtg atctcgacga	3300

accggcacct tagcgtgacg caccoggtgc acaagctgct gagcccgac taccgcgaca	3360
ccatgaccat caacgcgctg gcggcgacaga cgctcatcaa cgccggcggc atcttcgaga	3420
tgacggtgtt cccgggcaag ttgcggttg ggatgtcggc cgtggtgtac aaggactgga	3480
agttcaccca gcagggaactg ccggacgacg tcatcaagag gtacgtacct ggtaaagtgt	3540
atgaatgtgt aaaacaaatt gggcgctctg ctactgaca ggaacgtggt aaaaaaatg	3600
caggggcatg gcggtggagg acccgctgag cccgtacaag gtgcggttgc tgggtgcgga	3660
ctaccgctac gcggcgacg ggctggcgat ctggcagcc attgagcagt acgtgagcga	3720
gtacctggcc atctactacc cgaacgacgg cgtgctgcag ggcgatacgg aggtgcaggc	3780
gtggtggaag gagacgcgcg aggtcgggca cggcgacctc aaggacgccc catggtggcc	3840
caagatgcaa agtgtgccg agctggccaa ggcgtcacc accatcatct ggatcgggtc	3900
ggcgctgcat gcggcagtc acttcgggca gtaccctac gcggggttcc tccgaaccg	3960
gccgacggtg agccggcgcc gcatgccgga gcccggcacg gaggagtacg cggagctgga	4020
gcgcgacccg gagcgggcct tcatccacac catcacgac cagatccaga ccatcatcg	4080
cgtgtcgtg ctggaggtgc tgcgaagca ctctccgac gagctgtacc tcgggcagcg	4140
ggacacgccg gaggggacct cggacccaaa ggccctggag gtgttcaagc ggttcagcga	4200
ccggctggtg gagatcgaga gcaaggtggt gggcatgaac catgaccgg agctcaagaa	4260
ccgcaacggc ccggctaagt ttccctacat gctgctctac cccaacacct ccgaccacaa	4320
gggcgccgct gccgggctta ccgccaagg catccccaac agcatctcca tctaatttaa	4380
gccatcggca acc	4393

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004217

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/53, C12Q1/68, C12N9/08, C21C1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/53, C12Q1/68, C12N9/08, C21C1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, MEDLINE (STN),
BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/53720 A1 (CARLSBERG RESEARCH LABORATORY), 11 July, 2002 (11.07.02), & CN 1487995 A	1-13
A	KURODA, H. et al., "Characterization of Factors That Transform Linoleic Acid into Di-and Trihydroxyoctadecenoic Acids in Mash", Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, Vol.93, No.1, pages 73 to 77	1-13
A	SHIBATA, D. et al., "Plant lipoxygenases", J.Lipid Mediat.Cell Signal., 1995, Vol.12, Nos. 2 to 3; p.213-28	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 July, 2004 (13.07.04)

Date of mailing of the international search report

27 July, 2004 (27.07.04)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004217

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	B.W. Drost et al., "Flavor Stability", J.Am.Soc. Brew.Chem., 1990, Vol.48, No.4, pages 124 to 131	1-13
A	A.D. VILARINHOS et al., "Use of the Random Amplified Polymorphic DNA Technique to Characterize Soybean Genotypes", Rev.Brasil. Genet., 1994, Vol.17, No.3, pages 287 to 290	1-13
A	T.G. HESSLER et al., "Association of a Lipoxxygenase Locus, Lpx-B1, with Variation in Lipoxxygenase Activity in Durum Wheat Seeds", Crop Science, 2002, Vol.42, No.5, pages 1695 to 1700	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004217

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁷ C12N15/53, C12Q1/68, C12N9/08, C12C1/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁷ C12N15/53, C12Q1/68, C12N9/08, C12C1/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq MEDLINE (STN) BIOSIS (STN) WPIDS (STN) JICST774# (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 02/53720 A1 (CARLSBERG RESEARCH LABORATORY) 2002. 07. 11 & CN 1487995 A	1-13
A	KURODA H. et al., "Characterization of Factors That Transform Linoleic Acid into Di- and Trihydroxyoctadecenoic Acids in Mash", Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, Vol. 93, No. 1, p. 73-77	1-13
A	SHIBATA D. et al., "Plant lipoxygenases", J. Lipid Mediat Cell Signal., 1995, Vol. 12, No. 2-3, p. 213-28.	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 13. 07. 2004	国際調査報告の発送日 27. 7. 2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 田中 晴絵 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 9739

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	B.W.Drost et al., "Flavor Stability", J. Am. Soc. Brew. Chem., 1990, Vol. 48, No. 4, p. 124-131	1-13
A	A.D.VILARINHOS et al., "Use of the Random Amplified Polymorph- -ic DNA Technique to Characterize Soybean Genotypes", Rev. Brasil. Genet., 1994, Vol. 17, No. 3, p. 287-290	1-13
A	T.G.HESSLER et al., "Association of a Lipxygenase Locus, Lpx-B1, with Variation in Lipxygenase Activity in Durum Wheat Seeds", Crop Science, 2002, Vol. 42, No. 5, p. 1695-1700	1-13

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.